

**Hemmung der Thrombinbildung im Plasma durch Inhibitoren der
Frühphase der Gerinnung**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae
(Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Beate Wuchold
geboren am 26.03.1970 in Karl-Marx-Stadt.

Gutachter

1. Prof. Dr. J. Stürzebecher
2. PD Dr. B. Kaiser
3. Prof. Dr. K. Schrör

Tag der öffentlichen Verteidigung: 6. März 2007

Abkürzungsverzeichnis

Abbn.	Abbildungen
4-Amba	4-Amidinobenzylamid
α_2 AP	α_2 -Antiplasmin
APC	aktiviertes Protein C
AT	Antithrombin
ATE	Antithrombin-Einheiten
Boc	tertiär-Butyloxycarbonyl
BzIs	Benzylsulfonyl
Ca^{2+} -Ionen	Kalziumionen
EC_0	Inhibitorkonzentration, die nicht in der Lage ist, die Thrombinbildung zu unterdrücken.
EC_{100}	Inhibitorkonzentration, die zur Reduzierung der Thrombinbildung auf < 0,1 % notwendig ist.
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Faktor
HCII	Heparinkofaktor II
HMWK	hochmolekulares Kininogen
K_i	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes, Inhibitorkonstante
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
OD	optical density (Wellenlänge)
PAI-1	Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1
PK	Plasma-Kallikrein
PPK	Plasma-Präkallikrein
PL	Phospholipide
TF	tissue factor (Gewebsfaktor)
TFA	Trifluoressigsäure
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
t-PA	tissue-type plasminogen activator (Gewebe-Plasminogenaktivator)
U/min	Umdrehungen / min
u-PA	urokinase-type plasminogen activator (Urokinase)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Das Blutgerinnungssystem	3
2.2	Besonderheiten der Frühphase der Gerinnung	8
2.3	Proteaseinhibitoren als Therapeutika	12
2.3.1	Hemmstoffe der Enzyme der Frühphase	14
2.3.1.1	Inhibitoren des Plasmakallikreins	14
2.3.1.2	Inhibitoren von Faktor XIIa	15
2.3.1.3	Inhibitoren von Faktor XIa	15
2.4	Zielstellung	16
3	Materialien	17
3.1	Reagenzien zur Antikoagulation	17
3.2	Aktivatoren	17
3.3	Inhibitoren	18
3.3.1	Hemmstoffe der Frühphasenenzyme	18
3.3.2	Hemmstoffe für F Xa und die Frühphasenenzyme	21
3.4	Testkit	25
3.5	Sonstige Chemikalien	25
3.6	Geräte	25
4	Methoden	26
4.1	Thrombinbildung im Hirudinplasma	26
4.1.1	Bereitung von Hirudinplasma	26
4.1.2	Inkubation von Hirudinplasma	26
4.1.3	Bestimmung der Kontrollaktivität (0 %)	26
4.1.4	Bestimmung der maximalen Aktivität (100 %)	27
4.1.5	Antikoagulation von Vollblut mittels Inhibitor	27
4.1.6	Bestimmung von Prothrombinfragment F1+2	27

5	Ergebnisse	30
5.1	Einfluss von Proteaseinhibitoren auf die Thrombinbildung	30
5.1.1	Thrombinbildung im hirudin-antikoagulierten Plasma nach Aktivierung des Gerinnungssystems	32
5.1.2	Einfluss von Hemmstoffen der Frühphase der Gerinnung auf die Thrombinbildung	35
5.1.2.1	Einfluss von PK-Hemmstoffen auf die Thrombinbildung	35
5.1.2.2	Einfluss eines F XIa-Hemmstoffes auf die Thrombinbildung	37
5.1.2.3	Einfluss eines F XIIa-Hemmstoffes auf die Thrombinbildung	38
5.1.2.4	Thrombinbildung bei gleichzeitiger Hemmung von PK und F XIa	39
5.1.2.5	Thrombinbildung bei gleichzeitiger Hemmung von PK, F XIa und F XIIa	40
5.1.3	Thrombinbildung bei Hemmung der Frühphasenenzyme PK, F XIa und F XIIa sowie von F Xa	42
5.1.4	Thrombinbildung bei selektiver Hemmung von F Xa	44
5.1.5	Beeinflussung der Thrombinbildung durch Hemmstoffe bei Einsatz anderer Aktivatoren	47
5.1.5.1	Einfluss von Hemmstoffen auf die Thrombinbildung nach Aktivierung mit Innovin®	47
5.1.5.2	Einfluss von Hemmstoffen auf die Thrombinbildung nach Aktivierung mit Dapttin®	49
5.1.6	Antikoagulation von Vollblut mit CJ-1708	50
6	Diskussion	51
7	Schlussfolgerung	56
8	Literaturverzeichnis	57

Anhang

1 Zusammenfassung

Beim Einsatz von Hämodialyse, kardiopulmonalem Bypass und Koronarendoprothesen (Stents) in der modernen Notfallmedizin kommt es zum direkten Kontakt des Blutes mit unphysiologischen Oberflächen. Dabei wird eine Aktivierung des Gerinnungssystems, insbesondere auch über die Frühphasenenzyme Plasmakallikrein (PK), F XIa und F XIIa, ausgelöst. Da die bei diesen Eingriffen verwendeten Antikoagulanzen den Anforderungen an ein „ideales“ Antikoagulanzen nicht gerecht werden, konzentrieren sich die Forschungsarbeiten seit vielen Jahren auf die Entwicklung selektiver, hochwirksamer, synthetischer Inhibitoren der verschiedenen Gerinnungsenzyme, einschließlich Inhibitoren von Frühphasenenzymen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirksamkeit von Inhibitoren, die mit unterschiedlicher Effizienz die Frühphasenenzyme PK, F XIa und F XIIa hemmen, auf die Thrombinbildung nach Aktivierung der intrinsischen Gerinnung untersucht.

Für die Untersuchungen wurde hirudin-antikoaguliertes Plasma eingesetzt. Kaolin diente als Aktivator des intrinsischen Gerinnungssystems. Die Thrombinbildung wurde über die Bestimmung des Prothrombinfragments F1+2 erfasst.

Inhibitoren, die relativ spezifisch ein einzelnes Frühphasenenzym (PK, F XIa oder F XIIa) hemmen, verhinderten die Frühphasen-induzierte Thrombinbildung bei Konzentrationen von 10 µM bis 100 µM.

Mit Inhibitoren, die eine relativ hohe inhibitorische Wirksamkeit gegen alle 3 Frühphasenenzyme (PK, F XIa und F XIIa) besitzen, wurde die Thrombinbildung bei einer Konzentration von 10 µM vollständig gehemmt.

Es wurde gefunden, dass Inhibitoren, die zusätzlich zu den Frühphasenenzymen noch F Xa hemmen, die Thrombinbildung deutlich stärker verhindern als Hemmstoffe ohne Anti-FXa-Wirkung.

Die entscheidende Rolle, die F Xa auch nach intrinsischer Aktivierung im Gerinnungssystem einnimmt, wurde durch den Einsatz von hochspezifischen F Xa-Inhibitoren untermauert. Mit diesen Hemmstoffen wurde die durch die Aktivierung der Frühphasenenzyme induzierte Thrombinbildung bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen (0,1 µM) vollständig unterbunden.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass mit den verwendeten Inhibitoren der Frühphasenenzyme PK, F XIa und F XIIa eine

Hemmung der Thrombinbildung nach Aktivierung des intrinsischen Gerinnungsweges möglich ist. Eine direkte Inaktivierung von F Xa führte jedoch zu einer wesentlich stärkeren Hemmung der Thrombinbildung.

Um die Bildung von Thrombin und somit die Entstehung von Fibrin nach Kontakt des Blutes mit unphysiologischen Oberflächen zu verhindern, sind Hemmstoffe der Frühphasenenzyme offenbar nicht besser geeignet als F Xa-Hemmstoffe.

2 Einleitung

2.1 Das Blutgerinnungssystem

Im gesunden menschlichen Organismus existiert ein Gleichgewicht zwischen prothrombotischen und antithrombotischen Mechanismen. Durch das komplexe Zusammenspiel von gerinnungsfördernden und gerinnungshemmenden Prozessen wird dadurch unter physiologischen Bedingungen eine unerwünschte Thrombosierung eines Gefäßbezirkes ebenso verhindert wie eine exzessive Blutung. Bei der Regulation und Aufrechterhaltung der Homöostase des Blutgerinnungssystems spielen dynamische Wechselwirkungen zwischen plasmatischen, zellulären und vaskulären Faktoren eine entscheidende Rolle (Triplett 2000, Mann et al. 2003, Stassen et al. 2004, Aird 2005, Monroe und Hoffman 2006).

Das Blutgerinnungssystem setzt sich aus einer Folge biochemischer Reaktionen zusammen, die durch proteolytische Enzyme ausgelöst und unterhalten werden. Der regelrechte Ablauf der Gerinnung wird durch positive und negative Rückkopplungsmechanismen garantiert. Zusätzlich verhindern Proteaseinhibitoren auf jeder Stufe der Gerinnung überschießende Aktivierungsvorgänge.

Während der Gerinnung des Blutes werden in einer kaskadenähnlichen Reaktionsfolge die im Plasma vorliegenden inaktiven Proenzyme der Gerinnungsfaktoren durch proteolytische Spaltung in aktive Enzyme überführt (Davie et al. 1991, Berkner 2001, Mann et al. 2003, Norris 2003, Stassen et al. 2004). Bei einer Reihe von Gerinnungsfaktoren (F VIIa, F IXa und F Xa) ist die Bildung von Komplexen mit Phospholipiden (PL) und Kalziumionen (Ca^{2+} -Ionen) eine entscheidende Voraussetzung für ihre biologische Wirksamkeit (Berkner 2001, Mann et al. 2003, Norris 2003, Schenone et al. 2004, Stassen et al. 2004).

Bis auf die Faktoren V und VIII (F V und F VIII) gehören alle Gerinnungsenzyme zur Gruppe der Serinproteasen und werden in der Leber synthetisiert. Die Synthese der Faktoren II (Prothrombin), VII, IX und X ist abhängig von Vitamin K (Berkner 2001). Vitamin K ist als Kofaktor für die posttranslationale Carboxylierung von Glutaminsäureresten erforderlich. Die gebildeten γ -Carboxyglutaminsäurereste sind die Voraussetzung für die Bindung von Ca^{2+} -Ionen während der Gerinnungsaktivierung (Furie et al. 1999).

Das zentrale Ereignis der Blutgerinnung ist die Bildung von Thrombin, die auf zwei verschiedenen Wegen, dem extrinsischen und dem intrinsischen Weg, initiiert werden kann (Abb. 1).

Das extrinsische System wird bei Gefäßschädigung durch die Freisetzung des sogenannten Gewebefaktors (tissue factor, TF) gestartet (Berkner 2001, Norris 2003, Price et al. 2004, Stassen et al. 2004, Steffel et al. 2006). TF ist ein Protein, welches in Endothelzellen und Monozyten lokalisiert ist und als Kofaktor bei der Aktivierung von Faktor VII (F VII) wirkt (Østerud 1997, Price et al. 2004, Stassen et al. 2004, Steffel et al. 2006). Er bildet mit F VII einen 1:1 stöchiometrischen Komplex, wobei F VII oder bereits im Plasma vorhandene geringe Mengen F VIIa in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen an den Lipidteil von TF binden (Davie et al. 1991, Martin et al. 1995, Østerud 1997, Lwaleed und Bass 2006, Steffel et al. 2006).

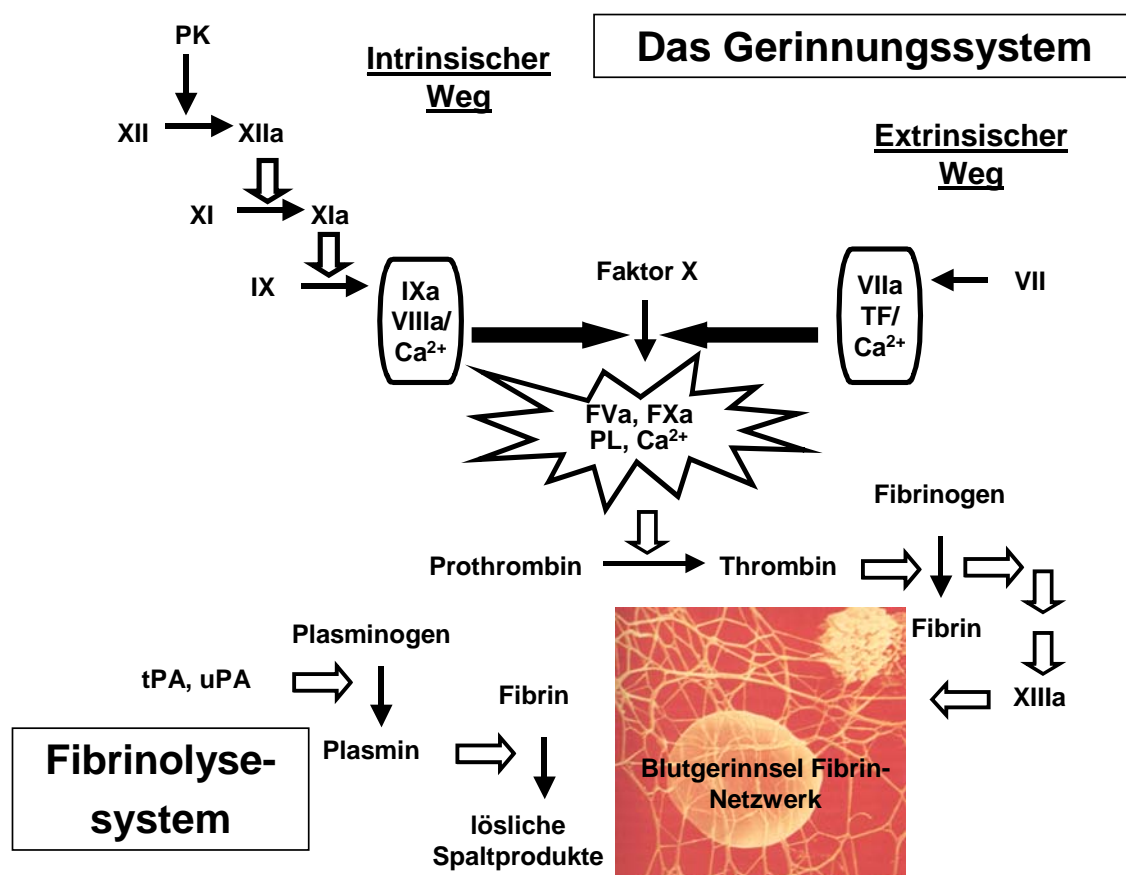


Abb. 1: Schematische Darstellung des Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systems

Die Aktivierung von F VII zu F VIIa erfolgt durch Autokatalyse oder durch andere Gerinnungsenzyme wie F IXa und F IXa (Berkner 2001, Mann et al. 2003, Stassen et al. 2004). Erst der an TF gebundene F VIIa weist eine ausreichende proteolytische Aktivität gegenüber F IX und F X auf, wodurch die katalytische Spaltung dieser Proenzyme und die daraus resultierende Bildung der entsprechenden aktiven Gerinnungsenzyme F IXa und F Xa erfolgt (Abb. 1) (Komiyama et al. 1990, Davie et al. 1991, Mann et al. 2003, Norris 2003, Stassen et al. 2004). Die initial gebildeten Mengen an F Xa führen zur Bildung einer ersten Menge Thrombin, das als Aktivator von Plättchen, F V und F VIII dient, woraus eine positive Rückkopplung mit starker Beschleunigung der Gerinnungsaktivierung resultiert (Brummel et al. 2002). Der von F IXa und F VIIIa in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen und PL der Plättchenmembran gebildete Tenase-Komplex ist der stärkste Aktivator von F X (Mann et al. 2003). F Xa führt in Gegenwart von PL, dem Kofaktor Va und Ca^{2+} -Ionen zu einer schnellen Umwandlung des Prothrombins (F II) zu Thrombin (F IIa) (Abb. 1). F Xa, F Va, PL und Ca^{2+} -Ionen werden in ihrer Gesamtheit als Prothrombinase-Komplex bezeichnet (Davie et al. 1991, Mann et al. 2003, Norris 2003, Schenone et al. 2004). Bei der proteolytischen Aktivierung des Prothrombins zum Thrombin durch im Prothrombinase-Komplex gebundenen F Xa wird das Fragment F1+2 im Verhältnis 1:1 abgespalten (Norris 2003). Die Menge an freigesetztem Prothrombinfragment ist proportional der Menge an gebildetem Thrombin. Aus diesem Grund wird Prothrombinfragment F1+2 als molekularer Marker für die Aktivierung der Gerinnung *in vivo* und insbesondere für die Bildung von Thrombin herangezogen (Bauer 1999). Im weiteren Verlauf der Gerinnungskaskade spaltet Thrombin vom Fibrinogen die Fibrinopeptide A und B ab. Die entstehenden Fibrinmonomere polymerisieren in der Folge zu löslichen Fibrinmonomer-Komplexen (lösliches Fibrin) (Mann et al. 2003, Norris 2003). Durch F XIIIa, eine ebenfalls durch Thrombin aktivierte Transglutaminase, entsteht aus den löslichen Polymerketten durch kovalente Quervernetzungen ein unlösliches Fibrinpolymer, das eigentliche Fibringerinnsel (Davie et al. 1991, Mann et al. 2003, Norris 2003).

Der Abbau des Fibrins erfolgt durch das fibrinolytische System. Hierbei kommt es zur Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin. Das gebildete Plasmin spaltet Fibrin und führt somit zu seiner Auflösung (Norris 2003). Die Fibrinolyse stellt einen wichtigen Kontrollmechanismus zur Begrenzung der Gerinnselbildung dar und dient der Aufrechterhaltung des hämostatischen Gleichgewichts.

Störungen in diesem komplexen System von Enzymreaktionen können zu thromboembolischen Erkrankungen oder hämorrhagischen Diathesen führen (Cawthern et al. 1998, Triplett 2000, Berkner 2001, Butenas et al. 2002).

Im intrinsischen System erfolgt, bedingt z.B. durch eine Verletzung des Gefäßendothels, eine Freilegung von Kollagen oder anderen subendothelialen Strukturen, die zu einer Aktivierung von F XII zu F XIIa (Kontaktaktivierung) führt. Verbunden damit ist die Umwandlung von Plasma-Präkallikrein (PPK) in eine aktive Protease, das Plasma-Kallikrein (PK), das seinerseits die Bildung von F XIIa aus seinen Vorstufen beschleunigt (Abb. 1). F XIIa aktiviert nun in Gegenwart eines Kofaktors, dem hochmolekularen Kininogen (HMWK), F XI zum F XIa. F XIa wiederum spaltet proteolytisch F IX zu F IXa (Davie et al. 1991, Edmunds 1993, Colman und Schmaier 1997, Kaplan et al. 1997, Norris 2003). F IXa bildet den schon beschriebenen Tenase-Komplex, der F X zu F Xa aktiviert (Abb. 1) (Norris 2003, Schenone et al. 2004). Besonderheiten der Frühphase der Gerinnung im intrinsischen System werden im Kapitel 2.2 ausführlich besprochen.

An hämostaseologischen Prozessen sind auch die die Blutgefäße auskleidenden Endothelzellen aktiv beteiligt, da sie sowohl antithrombotische als auch prothrombotische Eigenschaften besitzen (Aird 2005). Normales intaktes Endothel stellt eine athrombogene Oberfläche dar, an der weder eine Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems noch eine Adhäsion und Aggregation von Plättchen erfolgt. Hinzu kommt, dass Endothelzellen eine Vielzahl von Substanzen synthetisieren bzw. freisetzen, die den Gerinnungsprozeß hemmen oder die endogene Fibrinolyse steigern. Dazu gehören das vasodilatatorisch und plättchenaggregationshemmend wirkende Prostazyklin, Glykosaminoglykane mit heparinähnlichen Wirkungen wie z.B. Heparansulfat, der profibrinolytisch wirksame Gewebe-Plasminogenaktivator (tissue-type plasminogen activator, t-PA), Thrombomodulin, das für die Aktivierung von Protein C als endogenem Inhibitor des Gerinnungssystems erforderlich ist, sowie der physiologische Inhibitor der extrinsischen Gerinnung, tissue factor pathway inhibitor (TFPI) (Price et al. 2004, Aird 2005, Dahlbäck und Villoutreix 2005, Lwaleed und Bass 2006). Unter pathologischen Verhältnissen, z.B. bei einer Dysfunktion des Endothels, wird die Endotheloberfläche thrombogen, d.h. es dominieren proaggregatorische, prokoagulatorische und anti-fibrinolytische Eigenschaften. Zu den thrombogenen Faktoren der Endothelzellen

zählen von Willebrand-Faktor (vWF), TF und Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) (Norris 2003, Aird 2005, Steffel et al. 2006).

Im menschlichen Organismus existieren verschiedene endogene Kontrollmechanismen, um eine überschießende Aktivierung sowohl der Gerinnung als auch der Fibrinolyse mit den daraus resultierenden Folgen einer Thrombose oder einer Blutung zu verhindern. Die wichtigsten Inhibitoren im Gerinnungssystem sind Antithrombin (AT) und TFPI sowie die Komponenten des Protein C-Pathways. Im fibrinolytischen System sind insbesondere α_2 -Antiplasmin (α_2 AP) und PAI-1 von Bedeutung (Triplett 2000, Mann et al. 2003, Norris 2003, Price et al. 2004, Stassen et al. 2004, Dahlbäck und Villoutreix 2005, Lwaleed und Bass 2006).

Die Inhibitoren der plasmatischen Gerinnung sind Serinproteaseinhibitoren (Serpine), die an das aktive Zentrum des jeweiligen Gerinnungsfaktors binden und diesen dadurch inaktivieren. AT, ein in der Leber gebildetes α_2 -Globulin, inaktiviert insbesondere Thrombin und F Xa, aber auch andere Serinproteasen wie PK, Plasmin und F IXa, F XIa und F XIIa (Triplett 2000, Mann et al. 2003, Norris 2003, Stassen et al. 2004). Der entstehende irreversible Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT) läßt sich im Plasma messen und ist ein Maß für die Gerinnungsaktivierung. Die Geschwindigkeit der Komplexbildung ist sehr langsam, wird aber durch Heparin oder endogene Glykosaminoglykane wie Heparansulfat um ein Vielfaches beschleunigt (Huntington 2003). Heparin und heparinähnliche Verbindungen binden über eine hochaffine Pentasaccharidsequenz an AT, die dadurch induzierte Konformationsänderung im AT-Molekül führt zu einer schnellen Bindung an die Zielenzyme und deren Inaktivierung. Es muss hervorgehoben werden, dass im Fibrin eingeschlossenes Thrombin durch den Heparin-AT-Komplex nicht inaktiviert werden kann.

Neben AT gibt es den Heparinkofaktor II (HCII). HCII beschleunigt in Gegenwart von Glykosaminoglykanen wie Heparin oder Dermatansulfat ebenfalls die Inaktivierung von Thrombin (Huntington 2003).

Protein C, ein im Plasma vorkommendes, Vitamin-K-abhängiges Proenzym wird durch Thrombin in aktiviertes Protein C (APC) umgewandelt. APC ist eine Serinprotease, die nach Bindung an den Kofaktor Protein S die aktivierten Faktoren Va und VIIIa spaltet und dadurch inaktiviert (Schettler und Greten 1998, Dahlbäck und Villoutreix 2005). Die Aktivierung von Protein C durch Thrombin erfolgt erst nach Bindung beider Moleküle an den endothelialen Rezeptor Thrombomodulin. An Thrombomodulin gebundenes Thrombin verliert seine prokoagulatorischen Fähig-

keiten (Fibrinogenspaltung, Plättchenaktivierung, Aktivierung von Gerinnungsfaktoren) und hemmt seine eigene weitere Bildung (negativer Rückkopplungsmechanismus).

Ein weiterer physiologischer Inhibitor ist TFPI, ein in den letzten Jahren umfangreich charakterisierter Inhibitor vom Kunitz-Typ, der für die Kontrolle des extrinsischen Weges der Gerinnungsaktivierung bedeutsam ist (Price et al. 2004, Lwaleed und Bass 2006). In einem ersten Schritt bindet und inhibiert TFPI F Xa. In einem zweiten Schritt bindet der TFPI/F Xa-Komplex an den TF/FVIIa-Komplex und bildet auf diese Weise einen inaktiven quaternären Komplex (Lwaleed und Bass 2006).

Die meisten Inhibitoren der Fibrinolyse sind ebenfalls Serinproteaseinhibitoren. Der wichtigste Inhibitor, α_2 -Antiplasmin (α_2 AP), bildet einen stabilen, inaktiven α_2 AP-Plasmin-Komplex. F XIIIa baut unter anderem auch α_2 AP in Fibrin ein, wodurch die Bindung von aktivem Plasmin an Fibrin und somit die vorzeitige Lyse eines Gerinnsels verhindert wird (Norris 2003). Ein „Reserveinhibitor“ ist α_2 -Makroglobulin, das neben der Hemmung von Thrombin verschiedene Komponenten des Fibrinolyse-systems (Plasmin, Kallikrein, Urokinase und t-PA) inaktiviert. Plasminogen-aktivatorinhibitor Typ 1 (PAI-1) hemmt als wichtigster Inhibitor der Plasminogen-aktivatoren sowohl t-PA als auch Urokinase (u-PA) (Norris 2003).

2.2 Besonderheiten der Frühphase der Gerinnung

Die Aktivierung der intrinsischen Gerinnung erfolgt durch den Kontakt des Blutes mit einer „fremden“ oder unphysiologischen Oberfläche. Das können beispielsweise subendotheliales Kollagen, entzündliche Gefäßbereiche oder degenerativ veränderte Gefäßendothelien - wie bei der Arteriosklerose - sein. Aber auch körperfremde Materialien wie künstliche Herzklappen oder Koronarendoprothesen (Stents) können die Aktivierung einleiten (Edmunds 1993, Courtney und Forbes 1994, Colman und Schmaier 1997, Kaplan et al. 1997). Die intrinsische Gerinnungsaktivierung verläuft deutlich langsamer als die extrinsische Aktivierung und beinhaltet die vier wichtigen Plasmaproteine PK, F XIa, F XIIa sowie HMWK. In Gegenwart von PPK und HMWK unterliegt oberflächengebundener F XII (Hagemann-Faktor) einer Autoaktivierung, bei der F XII zu enzymatisch aktivem F XIIa gespalten wird (Kontaktaktivierung)

(Abb. 2) (Edmunds 1993, Colman und Schmaier 1997, Kaplan et al. 1997, Norris 2003).

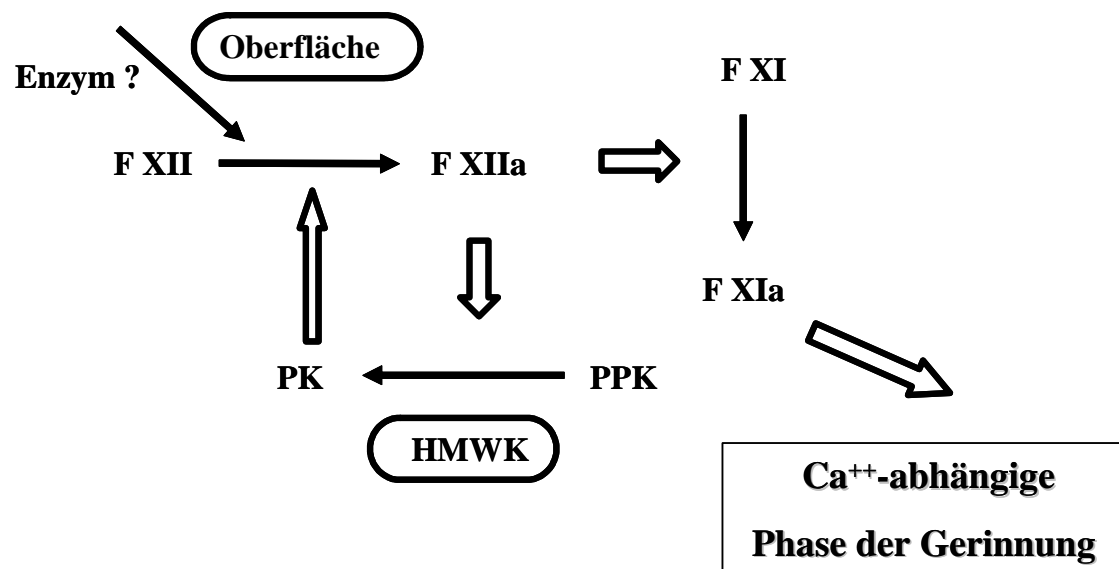


Abb. 2: Frühphase der Gerinnung

Es ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt, ob der F XII nur eine strukturelle Umformung im Molekül (Konformationsänderung) erfährt oder eine enzymatische Aktivierung durch Spuren eines aktiven Enzyms (z.B. Plasmin) erfolgt.

F XIIa aktiviert PPK zu PK, wobei HMWK als Aktivatormolekül anwesend sein muss. PK aktiviert daraufhin in einem positiven Rückkopplungsmechanismus weiteren F XII. Ist eine kritische Menge F XIIa gebildet, kann diese F XI zu F XIa aktivieren. Diese ersten Aktivierungsschritte laufen ohne die Beteiligung von Ca^{2+} -Ionen ab. Dagegen kann die durch F XIa im Komplex mit PL katalysierte Aktivierung von F IX zu F IXa, mit der die intrinsische Gerinnungskaskade weitergeführt wird, nur in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen stattfinden (Abb. 2) (Edmunds 1993, Colman und Schmaier 1997, Kaplan et al. 1997, Norris 2003).

Die Kontaktphase, die zur Aktivierung der beiden Proteasen F XIIa und PK führt, ist nicht nur für die Gerinnungsaktivierung von Bedeutung. Neben F XIIa hat PK noch eine Reihe weiterer spezifischer Substrate. So aktiviert PK auch das Proenzym des Plasminogenaktivators Urokinase (u-PA) und initiiert dadurch die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin. Auf diese Weise fördert PK die Fibrinolyse (siehe Abb. 1). Weiterhin spaltet PK aus HMWK Bradykinin ab (Abb. 3). Bradykinin setzt aus dem Endothel t-PA frei und hat damit einen weiteren profibrinolytischen Effekt. Außerdem bewirkt PK die Aktivierung des Renins im Renin-Angiotensin-System (Abb. 3) (Schmaier 2002).

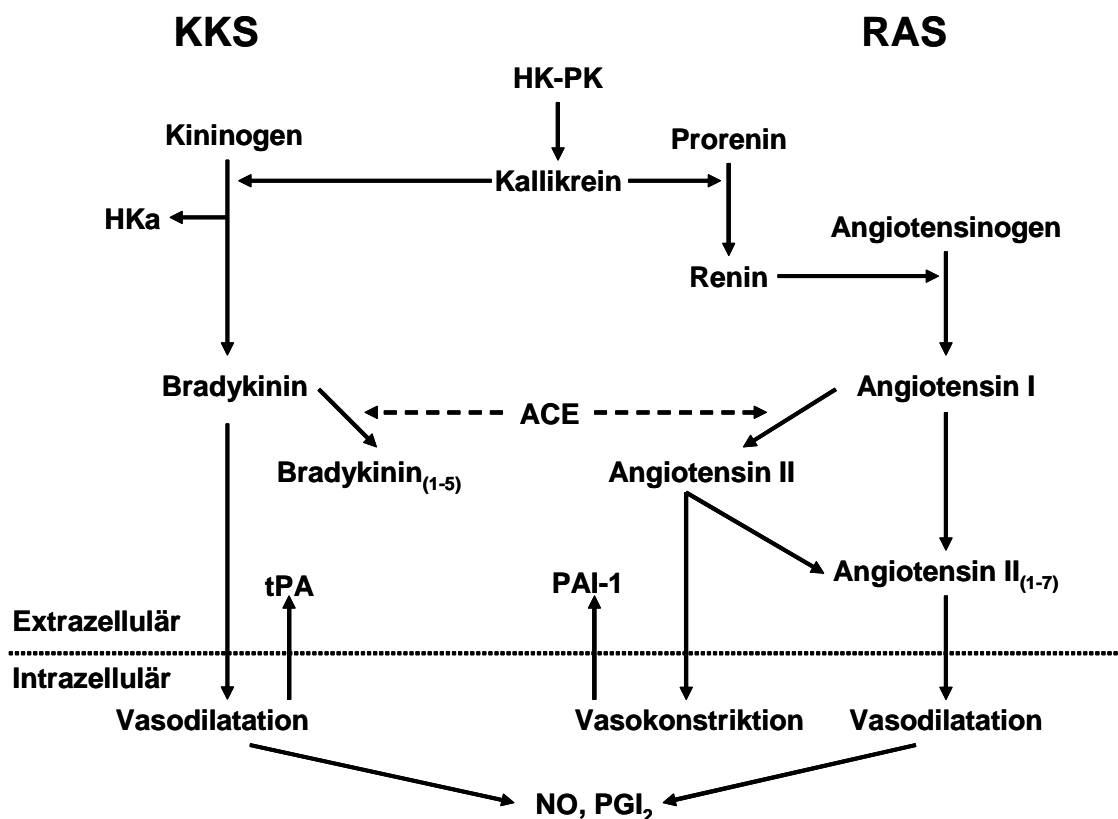


Abb. 3: Interaktion zwischen dem Kallikrein-Kinin-System (KKS) und dem Renin-Angiotensin-System (RAS)
 HK-PK = hochmolekulares Kininogen-Präkallikrein, ACE = Angiotensin-Converting-Enzym, PAI-1= Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1; tPA = Gewebe-Plasminogenaktivator, PGI₂ = Prostaglandin 2

Die selektive Regulation von PK mit synthetischen, niedermolekularen Inhibitoren könnte ein neuer Ansatz zur Prophylaxe und Therapie dieser Erkrankungen sein.

Zur Verhinderung der Frühphasen-induzierten Gerinnungsaktivierung stehen bis heute keine spezifischen Medikamente zur Verfügung. In der Regel werden bei Eingriffen, bei denen Blut in Kontakt mit unphysiologischen Oberflächen kommt, wie z.B. bei der extrakorporalen Zirkulation (kardiopulmonaler Bypass) oder der Hämodialyse, Standard-Antikoagulanzen wie Heparin oder Hirudin eingesetzt. Als indirekte bzw. direkte Thrombininhibitoren unterbrechen beide Wirkstoffe die Blutgerinnung, jedoch wird die Kontaktaktivierung der Frühphasenenzyme PK, F XIa und F XIIa nicht beeinflusst. Insbesondere das enzymatisch aktive PK kann unter diesen Bedingungen an einer Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und des Komplementsystems beteiligt sein, in deren Folge es zu einer generalisierten Entzündung oder zum Multiorganversagen kommen kann (Abb. 4).

Eine Hemmung der Frühphasenenzyme PK, F XIa und F XIIa scheint eine alternative Möglichkeit zu sein, die intrinsische Gerinnungskaskade zu beeinflussen.

2.3. Proteaseinhibitoren als Therapeutika

Eine pharmakologische Beeinflussung des Gerinnungssystems ist durch eine Hemmung von Gerinnungsenzymen möglich. Neben der Anwendung gebräuchlicher Antikoagulanzen wie Heparin, niedrigmolekularen Heparinderivaten und Vitamin-K-Antagonisten (Kumarinderivate) (Hoppensteadt et al. 2003, Nutescu et al. 2005) wird an der Entwicklung synthetischer, kleinmolekularer Inhibitoren von Gerinnungsenzymen gearbeitet, um sie als Alternativen für die Prophylaxe und Therapie thromboembolischer Erkrankungen einzusetzen (Quan und Wexler 2001, Weitz und Crowther 2003, Pauls et al. 2004, Quan und Smallheer 2004, Willardsen et al. 2004, Alexander und Singh 2005, Hirsh et al. 2005, Stürzebecher 2005, Ieko et al. 2006). Es ist bisher jedoch nur in wenigen Fällen gelungen, synthetische Proteaseinhibitoren als Arzneimittel in die Praxis zu überführen.

Die gegenwärtig klinisch genutzten Antikoagulanzen werden den Anforderungen an ein „ideales“ Antikoagulanz nicht gerecht. Es wurden deshalb in den letzten Jahren große Anstrengungen im Hinblick auf die Entwicklung von Hemmstoffen vor allem für

die Gerinnungsenzyme Thrombin und F Xa unternommen (Quan und Wexler 2001, Rai et al. 2001, Weitz und Crowther 2003, Leone et al. 2004, Alexander und Singh 2005, Nutescu et al. 2005, Ieko et al. 2006). Forschungsschwerpunkt bilden dabei reversibel bindende, niedermolekulare Inhibitoren mit möglicher oraler Bioverfügbarkeit und direkter, von endogenen Kofaktoren unabhängigen, inhibitorischen Wirksamkeit (Katakura et al. 1993, Kaiser et al. 1999, Sinha 1999, Rai et al. 2001, Pauls et al. 2004, Quan und Smallheer 2004, Koshio et al. 2005, Perzborn et al. 2005, Stürzebecher 2005).

Aufgrund der zentralen Stellung im Gerinnungsprozess bietet die Hemmung des Thrombins eine besonders effektive Möglichkeit, die Blutgerinnung zu regulieren. Der spezifischste natürliche Thrombininhibitor, der gegenwärtig bekannt ist, ist das Hirudin. Das Polypeptid aus 65 Aminosäuren (MW = 7000 Da), das ursprünglich aus dem medizinischen Blutegel isoliert wurde (Markwardt 1957, 1970), wird heute rekombinant hergestellt. Hirudin ist gut verträglich, zeigt eine relativ schnelle Clearance und wird z.T. durch Serum- und Nierenproteasen proteolytisch abgebaut. Es kann nur in der Klinik verabreicht werden, da mögliche Blutungskomplikationen eine exakte Therapiekontrolle erfordern (Hirsh et al. 2005).

Die gerinnungshemmende Wirkung des Hirudins ($K_i = 27 \text{ fM}$) war der Ausgangspunkt für die Suche nach niedermolekularen Thrombininhibitoren, da Hirudin zu Beginn der 1970er Jahre nur in geringen Mengen isoliert werden konnte. Ein Vorteil der niedermolekularen, synthetischen Inhibitoren besteht in ihrer potentiellen oralen Bioverfügbarkeit. Neben Hemmstoffen vom D-Phe-Pro-Arg-Typ (Bajusz et al. 1978, Kettner und Shaw 1979) konnten unter einer Reihe von Derivaten des Arginins (Okamoto et al. 1981) und des Benzamidins wirksame und selektive Thrombininhibitoren gefunden werden (Steinmetzer und Stürzebecher 2004). Ximelagatran, ein Prodrug des Melagatrans, ist der erste oral applizierbare direkte Thrombininhibitor, der zur Thromboseprophylaxe bei Patienten nach einer Hüft- oder Kniegelenkersatz-Operation zugelassen ist (Agnelli 2005, Hirsh et al. 2005).

Ein weiteres Zielenzym für therapeutisch einsetzbare Proteaseinhibitoren ist der Faktor Xa, der am Konvergenzpunkt des extrinsischen und intrinsischen Gerinnungsweges lokalisiert ist. Bis heute wurde eine große Anzahl von synthetischen F Xa-Hemmstoffen gefunden und zum Teil in klinische Studien überführt (Rai et al. 2001, Weitz und Crowther 2003, Pauls et al. 2004, Alexander und Singh 2005, Alexander et al. 2005, Ieko et al. 2006).

2.3.1 Hemmstoffe der Enzyme der Frühphase

2.3.1.1 Inhibitoren des Plasmakallikreins

Die Frühphasenenzyme PK, F Xla und F Xlla gehören wie Thrombin und F Xa zu den trypsinähnlichen Serinproteasen und stellen ebenfalls potentielle Zielenzyme für die Entwicklung von Inhibitoren dar.

Derzeit wird mit Aprotinin (Trasylo[®]) ein Proteasehemmstoff in der Klinik eingesetzt, der neben Plasmin auch PK ($K_i = 30 \text{ nM}$) hemmt. Bei ca. 10 % der Patienten, bei denen eine extrakorporale Zirkulation erforderlich ist, wird Trasylo[®] zur Verminderung von Blutverlusten i.v. injiziert (Swartz et al. 2004). Dabei ist aber offenbar das antifibrinolytische Potential aufgrund der Plasminhemmung Ursache für die Wirksamkeit.

Ein selektiver PK-Inhibitor ist DX-88 (MW = 7054 Da; 58 Aminosäuren). Er wird als rekombinantes Protein in der Hefe *Pichia pastoris* produziert und besteht aus den ersten Kunitz-Domänen des natürlichen Inhibitors TFPI. Neben einer Hemmung der Kontaktaktivierung unterdrückt DX-88 auch die Bildung von F VIIa (Tanaka et al. 2004). DX-88 wurde erstmals in einer Studie im Jahr 2003 eingesetzt und befindet sich derzeit in klinischen Studien der Phase II (Williams und Baird 2003).

Ein Nachteil für den therapeutischen Einsatz dieser Inhibitoren ist ihre Peptidstruktur, weshalb sie nur parenteral appliziert werden können. Möglicherweise besitzen kleinere Moleküle günstigere physikochemische Eigenschaften, die zu einer Verbesserung der pharmakokinetischen Parameter und insbesondere einer oralen Verfügbarkeit führen.

Im Gegensatz zu der großen Zahl von synthetischen Inhibitoren für Thrombin und F Xa wurden für PK erst wenige synthetische Hemmstoffe mit hoher Affinität und Selektivität gefunden. Bei der Suche nach PK-Hemmstoffen erwiesen sich verschiedene Bis-Benzamidine wie Pentamidin und verwandte Verbindungen mit K_i -Werten um $50 \text{ }\mu\text{M}$ als moderat wirksame Hemmstoffe. Ester von ω -Amino- und ω -Guanidinoalkylkarbonsäuren wurden ebenfalls als PK-Hemmstoffe beschrieben, deren Inhibitorkonstanten im mikromolaren Bereich liegen (Muramatu et al. 1982, Satoh et al. 1985, Teno et al. 1991). Die ersten selektiven und kompetitiven Inhibitoren, die sich vom Arginin bzw. Phenylalanin ableiten, wurden von der Arbeitsgruppe um Okamoto entwickelt (Okamoto et al. 1988, 1992). Sie hemmen PK mit K_i -Werten um $1 \text{ }\mu\text{M}$. Besonders wirksame Inhibitoren sind Verbindungen, die bei der

Bindung im aktiven Zentrum und nach Angriff des katalytisch wirksamen Ser¹⁹⁵ den Übergangszustand der Substratspaltung imitieren. Dazu gehören Tripeptidaldehyde, die eine kovalente Hemiacetalbindung zum Ser¹⁹⁵ ausbilden. Eine Serie von Tripeptidaldehyd-Derivaten wurde von Garrett et al. (1998 und 1999) auf ihre Selektivität und Affinität untersucht.

2.3.1.2 Inhibitoren von Faktor XIIa

F XIIa, eine zweite wichtige Protease bei der Kontaktaktivierung, wurde erst in den 1980er Jahren in die Untersuchungen über synthetische Hemmstoffe einbezogen. Das Guanidinoalkylcarbonsäurederivat FOY (Isobe 1981), Leupeptin und der Thrombinhemmstoff N α -Dansyl-L-arginin-4-ethylpiperidid (DAPA=OM 205) (Rattnoff 1981) besitzen eine Anti-F XIIa-Aktivität mit K_i-Werten im mikromolaren Bereich. Bei der systematischen Testung einer Serie von Peptidderivaten erwiesen sich das n-Heptylamid und der iso-Propylester des Tripeptids H-D-Pro-Phe-Arg-OH und die Argininalde H-D-Phe-Arg-H und Boc-D-Phe-Pro-Arg-H als Hemmstoffe von Faktor XIIa (Fareed et al. 1981). Silverberg und Kaplan (1982) synthetisierten das Chlormethylketon von H-D-Pro-Phe-Arg-OH und untersuchten die Kinetik der Hemmung von F XIIa. H-D-Pro-Phe-ArgCH₂Cl inaktiviert F XIIa zeitabhängig mit relativ hoher Geschwindigkeit. Stürzebecher et al. (1983) untersuchten Benzamidinderivate systematisch auf ihre Inhibitoraktivität gegenüber F XIIa. Im Vergleich zum Benzamidin besitzen Derivate mit hydrophoben Resten bzw. einer zweiten Amidinogruppe in der Seitenkette eine wesentlich stärkere Anti-FXIIa-Aktivität. Derivate von ω -Amidinophenyl- α -amino-alkylcarbonsäuren, vor allem primäre Amide der N α -substituierten 4-Amidinophenyl- α -aminobuttersäure, sind die stärksten Hemmstoffe (Stürzebecher et al. 1983).

2.3.1.3 Inhibitoren von Faktor XIa

Über eine Hemmung von F XIa liegen nur wenige Veröffentlichungen vor. Die erfolgreiche Isolierung dieses Gerinnungsfaktors über Benzamidin-Agarose lässt vermuten, dass als Inhibitoren Verbindungen vom Benzamidintyp in Frage kommen (Koide et al. 1976). Bei Untersuchungen von Delaria et al. (1997) erwies sich ein Serinproteaseinhibitor mit zwei Kunitz-ähnlichen Domänen als ein starker Hemmstoff für F XIa (K_i = 6 nM) und PK (K_i = 0,3 nM).

2.4 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirksamkeit von einer Reihe neu entwickelter Inhibitoren, die mit unterschiedlicher Effizienz die Frühphasenenzyme PK, F XIa und F XIIa hemmen, auf die Aktivierung der intrinsischen Gerinnung zu untersuchen. Als Vergleichsinhibitoren wurden Hemmstoffe verwendet, die für F Xa spezifisch waren. Als Maß für die Thrombinbildung wurde die Konzentration des entstandenen Prothrombinfragments F1+2 im Plasma bestimmt.

3 Materialien

3.1 Reagenzien zur Antikoagulation

Hirudin rekombinantes Hirudin
HBW 023 C101 (13442 ATE/mg)
Hoechst AG, Frankfurt/M.

EDTA 0,083 M (Sigma, Taufkirchen)

3.2 Aktivatoren

Kaolin gepufferte Kaolinsuspension (Kaolin 5 mg/ml)
PTT Reagenz
Diagnostica Stago / Roche, Mannheim

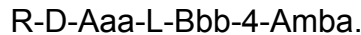
Dapttin[®] TC Kaolin/Sulfatid-Phospholipid
Technoclone GmbH, Wien

Innovin[®] Lyophilisat aus rekombinantem humanem
Gewebefaktor und synthetischen Phospholipiden
(Thromboplastin), Calciumionen, einer heparin-
neutralisierenden Verbindung, Puffer und
Stabilisatoren.
Dade Behring Marburg GmbH

Die Aktivatoren wurden entsprechend der Firmenangaben gelöst und mit 0,154 M NaCl oder Aqua bidest. weiter verdünnt.

3.3 Inhibitoren

Die eingesetzten Inhibitoren gehören alle einem einheitlichen Typ von Benzamidinderivaten an, dem die folgende gemeinsame allgemeine Formel zugrunde liegt:



Dabei sind über Peptidbindungen eine D-Aminosäure (D-Aaa), eine L-Aminosäure (L-Bbb) und 4-Amidinobenzylamin (4-Amba) miteinander verbunden. Die N-terminale Aminogruppe von D-Aaa ist mit einem Arylsulfonylrest R geschützt, bei dem es sich gewöhnlich um einen Benzylsulfonyl-Rest (Bzls) handelt.

Von diesem Typ wurden Hemmstoffe für Urokinase (Schweinitz et al. 2004), F Xa (Stürzebecher et al. 2001, 2003, 2005) sowie die Frühphasenenzyme PK, F XIa und F XIIa (Stürzebecher et al. 2004) beschrieben. Aus diesen großen Serien von Derivaten wurden repräsentative Verbindungen für die Hemmung von F Xa und die Frühphasenenzyme ausgewählt. Die Inhibitorkonstanten (K_i) und die Molmassen aller eingesetzten Hemmstoffe sind in Tabelle 1 (Seite 24) aufgeführt.

3.3.1 Hemmstoffe der Frühphasenenzyme

CJ-1423

CJ-1423 ist ein relativ selektiver Hemmstoff von PK (Stürzebecher et al. 2004). Die Verbindung enthält die unnatürlichen Aminosäuren D-(ω -Benzoyloxycarbonyl)-diaminopropionsäure (D-Dap(Boc)) und L-(3-Aminomethyl)-phenylalanin (Abb. 5).

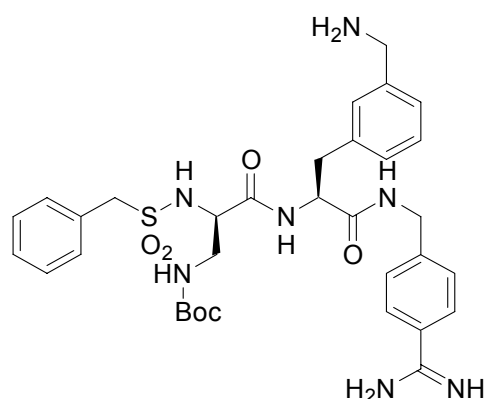


Abb. 5: Chemische Struktur des Inhibitors CJ-1423
Bzls-D-Dap(Boc)-L-Phe(3-AMe)-4Amba

CJ-1424

Die Verbindung hemmt ebenfalls relativ selektiv PK (Stürzebecher et al. 2004). CJ-1424 ist CJ-1423 sehr ähnlich. Sie enthält die ungeschützte D-Diaminopropionsäure (D-Dap) anstelle von D-(ω-Benzoyloxycarbonyl)-diaminopropionsäure (D-Dap(Boc)) (Abb. 6).

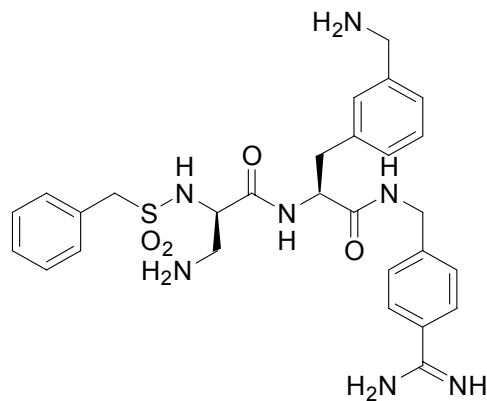


Abb. 6: Chemische Struktur des Inhibitors CJ-1424
Bzls-D-Dap-L-Phe(3-AMe)-4Amba

CJ-675

Die Verbindung ist ein besonders wirksamer Hemmstoff für F Xla (Stürzebecher et al. 2004). CJ-675 enthält die Aminosäuren D-(t-Butyl)-serin (Ser(tBu)) und L-4-Hydroxyprolin (Hyp) (Abb. 7).

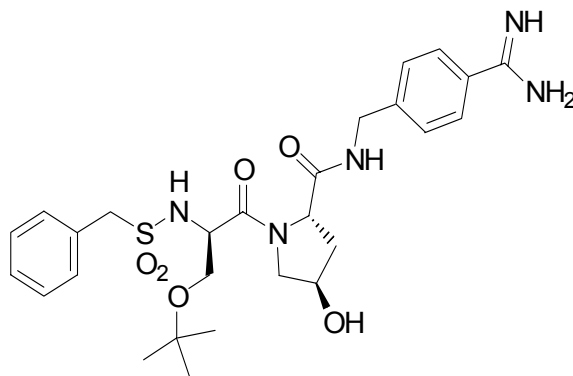


Abb. 7: Chemische Struktur des Inhibitors CJ-675
Bzls-D-Ser(tBu)-L-4(R)-Hyp-4Amba

CJ-1408

Die Verbindung ist ein wirksamer Hemmstoff für F XIIa (Stürzebecher et al. 2004). CJ-1408 enthält wie CJ-675 die Aminosäure D-(t-Butyl)-serin (Ser(tBu)). In der 2. Position befindet sich (4-Aminomethyl)-phenylalanin in razemischer Form (D/L) (Abb. 8).

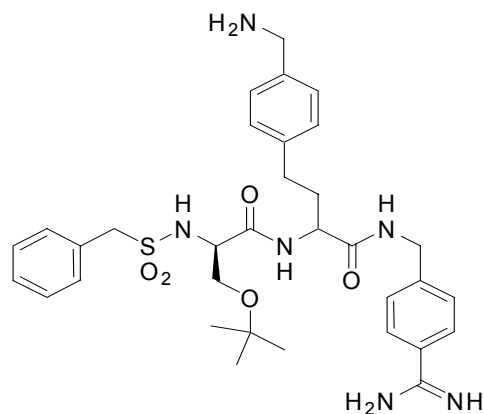


Abb. 8: Chemische Struktur des Inhibitors CJ-1408
Bzls-D-Ser(tBu)-D/L-Phe(4AMe)-4Amba

CJ-1714

Das Derivat CJ-1714 hemmt neben PK auch F XIa (Stürzebecher et al. 2004). Die Verbindung enthält die unnatürliche Aminosäure D-Cyclohexylalanin (D-Cha) und in der 2. Position eine mit 4-Amino-benzylamin substituierte Glutaminsäure (Glu(4-NH₂-benzylamin)) (Abb. 9).

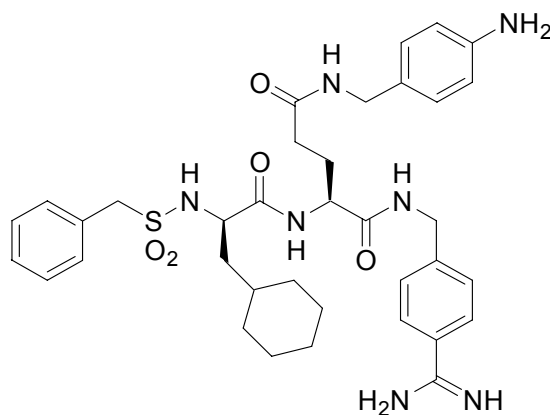


Abb. 9: Chemische Struktur des Inhibitors CJ-1714
Bzls-D-Cha-L-Glu(4-NH₂-benzylamin)-4-Amba

CJ-1712

Verbindung CJ-1712 hemmt neben PK auch F Xla und F Xlla (Stürzebecher et al. 2004). Sie ist CJ-1714 strukturell sehr ähnlich, lediglich die Aminosäure D-Cyclohexylalanin ist durch D-homo-Phenylalanin ersetzt (Abb. 10).

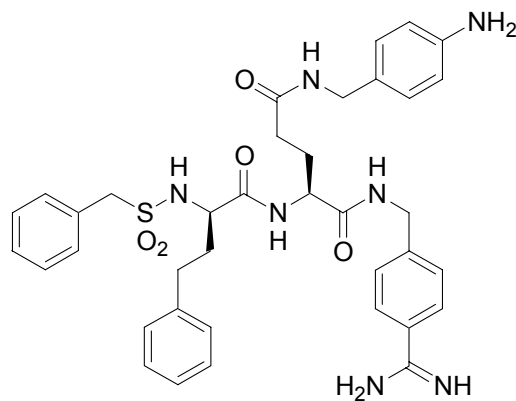


Abb. 10: Chemische Struktur des Inhibitors CJ-1712
Bzls-D-hPhe-L-Glu(4-NH₂-benzylamin)-4-Amba

3.3.2 Hemmstoffe für F Xa und die Frühphasenenzyme

CJ-1703a

Verbindung CJ-1703a ist ein F Xa-Hemmstoff (Stürzebecher et al. 2005), der neben F Xa auch PK, F Xla und F Xlla hemmt. Verbindungen dieser Substanzklasse enthalten ein D-(Pyridyl)-homo-alanin bzw. das entsprechende N-Oxid in der 3. Position. CJ-1703a besitzt das entsprechende 4-Pyridin-Derivat (D-hAla(4-Pyr)). In der 2. Position befindet sich eine mit Benzylamin substituierte Glutaminsäure (Glu(benzylamin)) (Abb. 11).

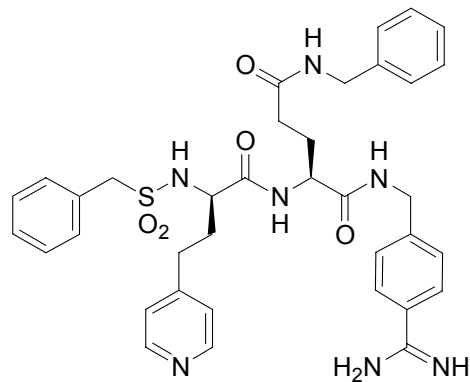


Abb. 11: Chemische Struktur des Inhibitors CJ-1703a
BzIs-D-hAla(4-Pyr)-L-Glu(benzylamin)-4-Amba

CJ-1708

CJ-1708 ist Verbindung CJ-1703a strukturell ähnlich, besitzt aber in der 2. Position ein L-Prolin (L-Pro). CJ-1708 hemmt F Xa und PK, F XIa sowie F XIIa (Stürzebecher et al. 2005) (Abb. 12).

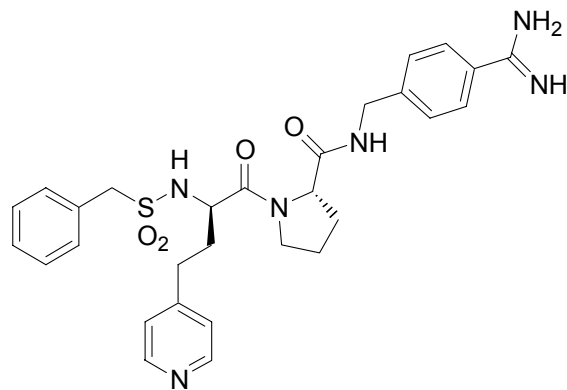


Abb. 12: Chemische Struktur des Inhibitors CJ-1708
BzIs-D-hAla(4-Pyr)-L-Pro-4-Amba

CJ-1332

CJ-1332 ist ein selektiver F Xa-Hemmstoff und besitzt ein D-(2-Pyridyl-N-oxid)-homoalanin (D-hAla(2-Pyr-NO)) neben einem Glycin (Gly) (Stürzebecher et al. 2005) (Abb. 13).

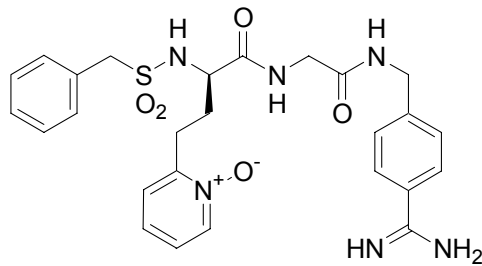


Abb. 13: Chemische Struktur des Inhibitors CJ-1332
Bzls-D-hAla(2-Pyr-NO)-Gly-4-Amba

CJ-641

Auch CJ-641 ist ein selektiver F Xa-Hemmstoff trägt aber in der 3. Position ein D-Arginin (D-Arg) und kein Pyridyl-homo-alanin (Stürzebecher et al. 2003) (Abb. 14).

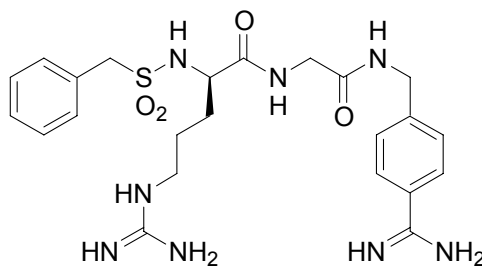


Abb. 14: Chemische Struktur des Inhibitors CJ-641
Bzls-D-Arg-Gly-4-Amba

Tabelle 1: Inhibitor konstanten K_i für die Hemmung von PK, F Xla, F Xlla, F Xa und Thrombin durch die eingesetzten Inhibitoren
 Es wurden die K_i -Werte gelb markiert, die eine besonders starke Hemmwirkung gegenüber den einzelnen Zielenzymen bedeuten.

Inhibitor	Molmasse (g/mol)	K_i (μM)				
		PK	F Xla	F Xlla	F Xa	Thrombin
CJ-1423	893,85 (x 2 TFA)	0,00037	0,42	1,9	0,061	4,4
CJ-1424	793,73 (x 3 TFA)	0,00056	0,79	2,6	0,17	20
CJ-675	673,71 (x TFA)	0,012	0,0083	4,6	0,098	0,0033
CJ-1408	864,85 (x 2 TFA)	0,031	0,64	0,07	0,45	0,088
CJ-1714	917,9 (x 2 TFA)	0,00035	0,0016	0,54	0,041	0,027
CJ-1712	925,9 (x 2 TFA)	0,0044	0,0089	0,058	0,03	1,4
CJ-1703a	797,8 (x 2 TFA)	0,0083	0,04	0,059	0,0057	1,7
CJ-1708	790,7 (x 2 TFA)	0,0023	0,019	0,14	0,0017	0,0019
CJ-641	744,67 (x 2 TFA)	0,084	0,8	0,35	0,0035	1,6
CJ-1332	598,67 (x TFA)	0,37	1,7	0,14	0,00032	2,7

TFA = Trifluoressigsäure

3.4 Testkit

Enzymimmunoassay Enzygnost F1+2 micro
(Behringwerke AG, Marburg)

3.5 Sonstige Chemikalien

Dulbecco's
Phosphate-Buffered Saline
(D-PBS) mit CaCl_2 , MgCl_2 GIBCO TM, Invitrogen, Belgien

3.6 Geräte

Zentrifugen:	Biofuge 15R, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland Biofuge pico, Heraeus, Osterode, Deutschland
Ultraschallgerät:	Sonorex Super 10 P, Bandelin, Berlin, Deutschland
Spectrofotometer:	Labsystems EMS Reader MF Typ 1401, Labsystems, Helsinki, Finnland
Inkubator:	Heidolph Inkubator 1000, Heidolph GmbH, Kelheim, Deutschland
Schüttel-und Mischgerät:	Heidolph Unimax 1010, Heidolph GmbH, Kelheim, Deutschland

4 Methoden

4.1 Thrombinbildung im Hirudinplasma

4.1.1 Bereitung von Hirudinplasma

Venenblut von gesunden, freiwilligen Spendern wurde unmittelbar nach der Entnahme mit Hirudinlösung (2000 ATE/ml in 0,154 M Kochsalzlösung) im Verhältnis 1:10 (1 Teil Hirudin + 9 Teile Blut) gemischt und anschließend bei Raumtemperatur für 10 min bei 1300 U/min zentrifugiert. Das als Überstand erhaltene Hirudinplasma wurde abpipettiert und sofort für Experimente verwendet.

4.1.2 Inkubation von Hirudinplasma

In genormten Gefäßen (Polypropylenröhrchen) wurden 900 µl Hirudinplasma zu 50 µl 0,154 M NaCl (Kontrollen) bzw. 50 µl Inhibitor und 50 µl Aktivator hinzugegeben und anschließend bei 37 °C unter leichtem Schütteln (Schüttelfrequenz 180/min) inkubiert. Als Aktivatoren des Gerinnungssystems wurden Kaolin, Dapttin[®] und Innovin[®] verwendet. Kaolin wurde im Verhältnis 1:250, Innovin[®] im Verhältnis 1:5 und Dapttin[®] im Verhältnis 1:50 eingesetzt. Die Ansätze, in denen Kaolin als Aktivator diente, wurden vor Hinzugabe des Hirudinplasmas für 15 min bei Raumtemperatur im Ultraschallbad behandelt. Über einen Zeitraum von 5 Stunden wurden im Abstand von 1 h jeweils 150 µl Plasma aus den Inkubationsansätzen entnommen. Eine weitere Bildung von Prothrombinfragment F1+2 wurde durch Zugabe von 10 µl EDTA-Lösung (0,083 M) verhindert. Die Proben wurden gut gemischt und zur Aufbewahrung sofort bei –20 °C eingefroren.

4.1.3 Bestimmung der Kontrollaktivität (0 %)

In diesen Ansätzen wurden 900 µl Plasma mit 100 µl NaCl (0,154 M) versetzt. Sie dienten der Bestimmung der Kontrollaktivität. Die Inkubation sollte lediglich den Gehalt des Spenderblutes an Prothrombinfragment F1+2 (0 h) und die geringe, durch das Inkubationsgefäß bedingte Aktivierung (~1 nM) wiedergeben.

4.1.4 Bestimmung der maximalen Aktivität (100 %)

Zur Erfassung der Menge des maximal aktivierbaren Prothrombins (100 %) wurden 900 µl Hirudinplasma zu 50 µl NaCl (0,154 M) und 50 µl Aktivator hinzugegeben. Dazu wurden Kaolin, Daptin® und Innovin® in höheren Konzentrationen als unter Abschnitt 4.1.2 erwähnt verwendet. Kaolin und Daptin wurden im Verhältnis 1:50 bzw. 1:10 verdünnt. Innovin® wurde unverdünnt verwendet. Die Ansätze wurden ebenfalls inkubiert. Nach 5 h wurde eine Probe zur Bestimmung von Prothrombinfragment F1+2 entnommen.

4.1.5 Antikoagulation von Vollblut mittels Inhibitor

Venenblut von gesunden, freiwilligen Spendern wurde unmittelbar nach der Entnahme mit Inhibitorlösung verschiedener Konzentrationen im Verhältnis 1:10 gemischt, ohne dass Zitrat oder ein anderes Antikoagulanz eingesetzt wurden. Über den Beobachtungszeitraum wurde das Vollblut bei Raumtemperatur aufbewahrt. Zu festgelegten Zeiten (0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 8 h) wurden 600 µl Vollblut entnommen und zu 40 µl EDTA (0,083 M) hinzugegeben. Die Proben wurden gemischt und 5 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma bei –20 °C eingefroren.

4.1.6 Bestimmung von Prothrombinfragment F1+2

Zur Bestimmung des Prothrombinfragments F1+2 wurde ein Enzymimmunoassay (Enzygnost F1+2 micro; Dade Behring Marburg GmbH) eingesetzt, der nach dem Sandwich-Prinzip arbeitet.

Vor der Bestimmung wurden die Proben langsam bei Zimmertemperatur aufgetaut. Alle verwendeten Reagenzien und Proben waren vor Testbeginn auf Raumtemperatur erwärmt worden.

In die Vertiefungen der Mikrotitrationsplatte, die mit einem Antikörper gegen F1+2 beschichtet ist, wurden 50 µl Probenpuffer F1+2 vorgelegt. Anschließend wurden in die Vertiefung 50 µl Standard, Kontrolle oder Probe pipettiert. Danach wurde die Testplatte kurz bewegt, um vollständiges Durchmischen zu gewährleisten. Die abgedeckte Platte wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert (Abb. 15). Während dieser

Inkubation bindet sich das in der Probe vorhandene F1+2-Antigen (Prothrombinfragment) an die Antikörper gegen F1+2, die an der Oberfläche der Mikrotitrationsplatte fixiert sind (Abb. 15).

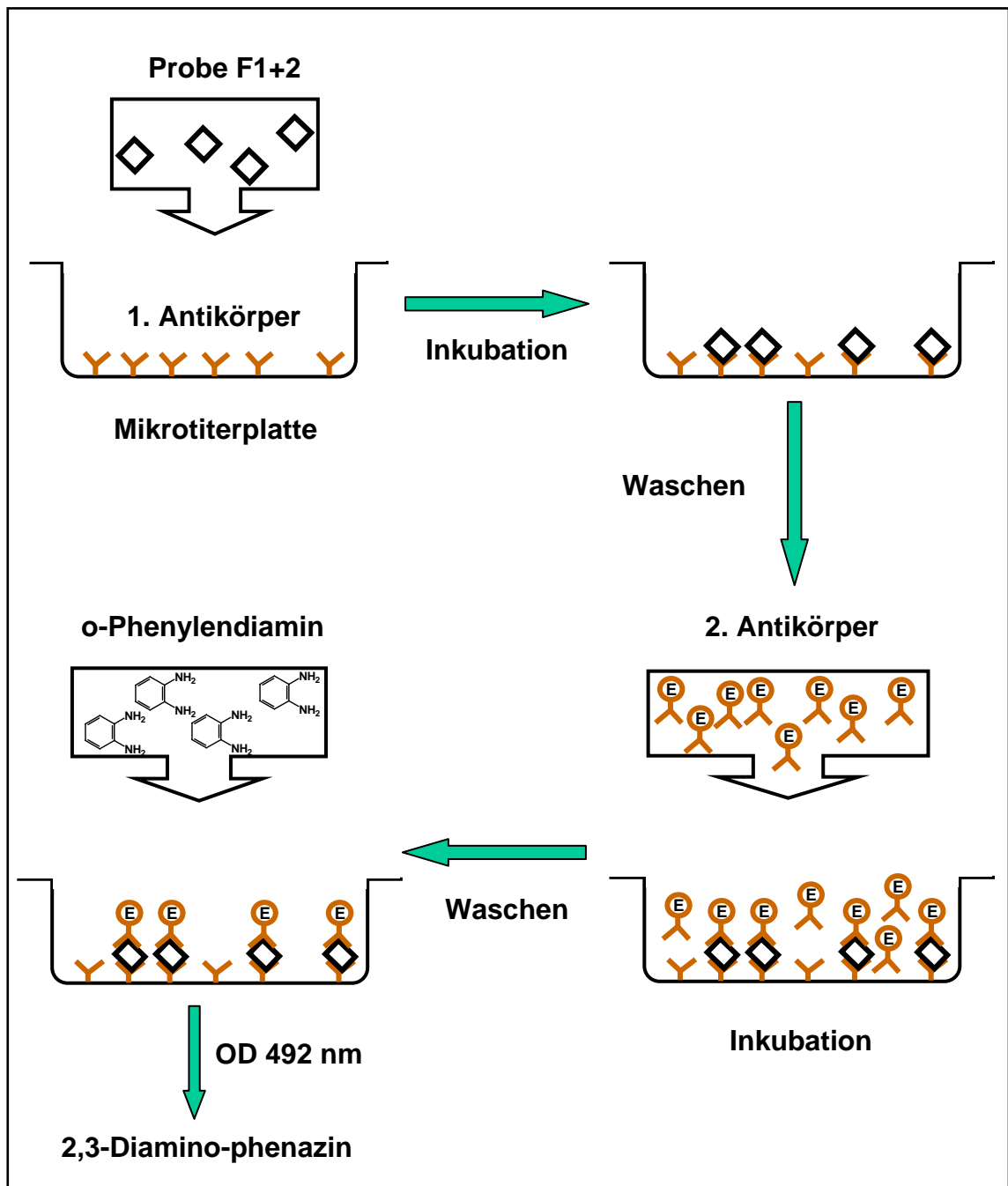


Abb. 15: Schema der immunologischen Bestimmung von Prothrombinfragment F1+2

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der nicht gebundene Antikörper mit dem Überstand aus den Vertiefungen der Platte entfernt. Die Platte wurde anschließend zweimal mit PBS-Puffer ausgewaschen. Nach dem Auswaschen wurde in einer zweiten Reaktion der Peroxidase-konjugierte Antikörper gegen Human-Prothrombin (Konjugatlösung) an die freien F1+2-Determinanten gebunden. Die abgedeckte Platte wurde erneut für 15 min bei 37 °C inkubiert (Abb. 15). Danach wurden die überschüssigen Enzym-konjugierten Antikörper ausgewaschen. Anschließend wurde die gebundene Peroxidaseaktivität bestimmt. Hierzu wurden in jede Vertiefung 100 µl einer frisch angesetzten Lösung von o-Phenylendiamin eingefüllt. Durch die Peroxidase wird in Gegenwart von Wasserstoffperoxid o-Phenylendiamin zu 2,3-Diamino-phenazin umgesetzt (Abb. 16).

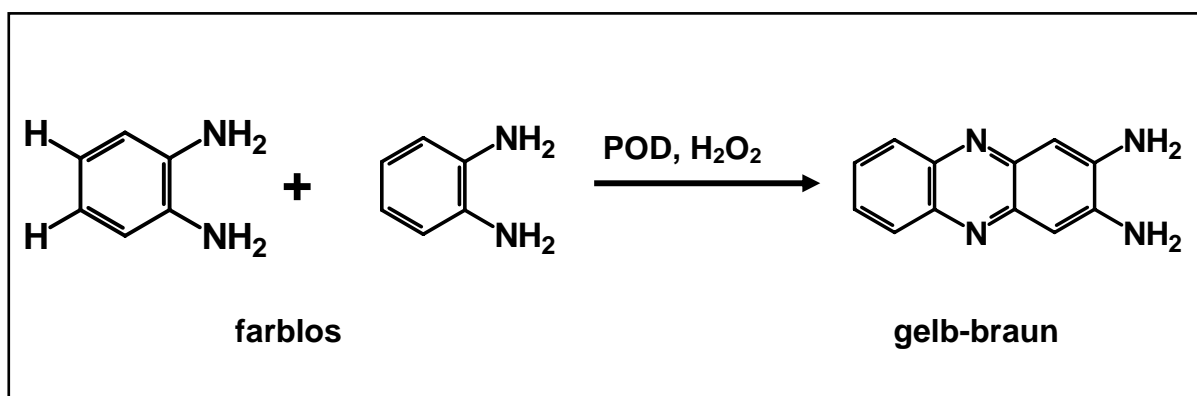


Abb. 16: Oxidation von o-Phenylendiamin zu 2,3-Diamino-phenazin in Gegenwart von Peroxidase (POD) und H_2O_2

Mit der Bildung von 2,3-Diamino-phenazin entwickelt sich eine gelbbraune Färbung. Nach 15 min wurde die Umsetzungsreaktion mit verdünnter Schwefelsäure abgebrochen (Zugabe von 100 µl Stopplösung). Die in diesem Zeitraum gebildete Farbintensität ist der Menge an gebundenem POD direkt proportional und damit auch der Menge des aus den Proben stammenden F1+2-Fragments. Die photometrische Bestimmung der Extinktion erfolgte bei 492 nm.

5 Ergebnisse

5.1 Einfluss von Proteaseinhibitoren auf die Thrombinbildung

Es war das Ziel der Untersuchungen, den Einfluss von Inhibitoren, insbesondere von Hemmstoffen der Frühphasenenzyme, auf die Thrombinbildung zu testen und Zusammenhänge zwischen Angriffspunkt des Inhibitors und gerinnungshemmendem Potential herzustellen.

Die in die Untersuchungen einbezogenen Inhibitoren wiesen eine unterschiedliche Selektivität hinsichtlich ihrer Hemmaktivität gegenüber den verschiedenen Gerinnungsfaktoren auf (Tabelle 1, Seite 24). Es wurden zunächst Substanzen mit einer hohen Selektivität gegenüber den Gerinnungsenzymen PK, F Xla und F Xlla ausgewählt. Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, hemmen in Bezug auf die Frühphasenenzyme die Verbindungen CJ-1423 und CJ-1424 bevorzugt PK. CJ-675 und CJ-1408 sind im Gegensatz zu CJ-1423 und CJ-1424 deutlich stärkere Hemmstoffe für F Xla bzw. F Xlla. Allerdings zeigt schon der Vergleich für diese 4 Substanzen, dass die Inhibitoren keine absolut selektive, jeweils auf nur ein Enzym gerichtete Hemmwirkung aufweisen. Auf Grund der Ähnlichkeit der Bindungsbereiche der nahe verwandten Enzyme ist lediglich eine relativ spezifische Wirksamkeit durch Variation der chemischen Struktur zu erreichen.

Aus diesem Grund finden sich unter den verschiedenen Strukturvarianten viel häufiger Substanzen mit geringerer Selektivität gegenüber einem ausgewählten Zielenzym wie die Derivate CJ-1714 und CJ-1712, die neben PK auch F Xla und F Xlla hemmen. Noch unspezifischer ist die Hemmaktivität der Verbindungen CJ-1703a und CJ-1708, die neben den Enzymen der Frühphase auch F Xa wirksam inaktivieren (Tabelle 1). Da die beiden letztgenannten Inhibitoren die größte Wirksamkeit bei der Hemmung der Thrombinbildung im hirudin-antikoagulierten Plasma zeigten (Kap. 5.1.3), war es folgerichtig, auch selektive Hemmstoffe des F Xa wie CJ-641 und CJ-1332 in die Untersuchungen einzubeziehen.

Um die Problematik zur Entwicklung selektiver Hemmstoffe noch etwas weiter zu beleuchten, enthält Tabelle 1 auch die K_i -Werte für die Hemmung von Thrombin durch die eingesetzten Verbindungen. Tatsächlich hemmen die meisten Substanzen Thrombin nicht oder nur geringfügig. CJ-675, CJ-1708, CJ-1408 und CJ-1714 sind

allerdings auch starke Thrombinhemmstoffe. Bei Arbeiten im hirudin-antikoagulierten Plasma hat eine zusätzliche Thrombinhemmung keinen Einfluss. Bei anderen Untersuchungen muss die Selektivität von Hemmstoffen jedoch in einem breiteren Umfang betrachtet werden.

Für die Untersuchungen wurde hirudin-antikoaguliertes Plasma verwendet. Hirudin ist ein spezifischer Inhibitor, der selektiv nur Thrombin ($K_i = 27 \text{ fmol/l}$) und keine anderen Serinproteasen hemmt (Stone und Hofsteenge 1986). Auf Grund der hohen Affinität zum Thrombin verhindert Hirudin im Blut bei einer Konzentration von $\geq 100 \text{ ATE/ml}$ die Fibrinogengerinnung vollständig. Zitrat-antikoaguliertes Plasma war für die vorgesehenen Untersuchungen nicht geeignet, da durch die Komplexbildung der Kalziumionen alle kalzium-abhängigen Schritte - und das ist die Mehrzahl der Aktivierungsvorgänge - blockiert sind.

Das hirudin-antikoagulierte Plasma musste immer frisch eingesetzt werden, da in den verwendeten Polypropylenröhrchen trotz Gegenwart von Hirudin über den Beobachtungszeitraum von 5 h eine geringe, aber nachweisbare Aktivierung von Prothrombin stattfand. Abb. 17 zeigt den Verlauf der Bildung von Prothrombinfragment F1+2 für die Einzelplasmen von 6 Spendern (Kontrollansätze). In dem Zeitraum von 5 h werden 0,4 nM bis 5 nM - im Mittel ca. 2 nM - Thrombin gebildet. In Vorversuchen konnten keine Reagenzröhrchen aus anderem Material als Polypropylen gefunden werden, bei denen eine geringere Aktivierung auftrat.

Die Thrombinbildung im hirudin-antikoagulierten Plasma wurde auch von anderen Autoren beschrieben (Kaiser et al. 1991, 1992; Prasa 1992).

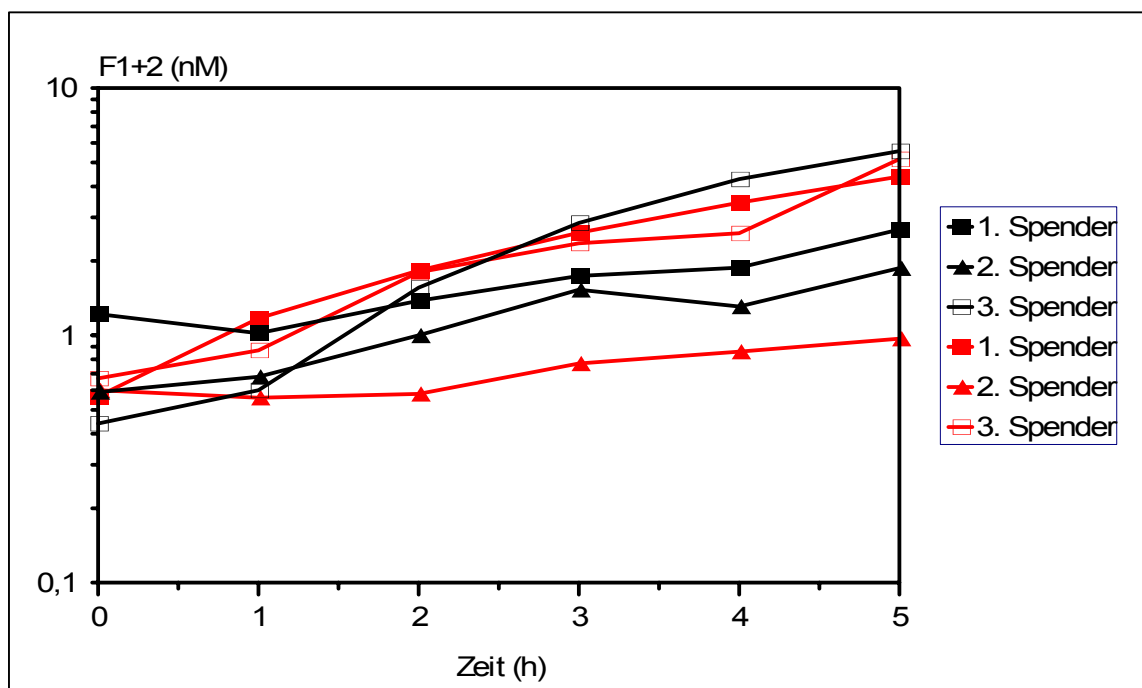


Abb. 17: Aktivierung von Prothrombin im Hirudinplasma ohne Zusatz von Aktivator
Die Abbildung zeigt jeweils den Verlauf der Bildung von Prothrombinfragment F1+2 für die Einzelplasmen der Versuche mit Inhibitor CJ-1423 (schwarze Kurven) und CJ-1708 (rote Kurven).

5.1.1 Thrombinbildung im hirudin-antikoagulierten Plasma nach Aktivierung des Gerinnungssystems

Zur Aktivierung des Gerinnungssystems wurden drei verschiedene Agenzien verwendet. Als Aktivator für die intrinsische Gerinnung wurden Kaolin und Dapttin® eingesetzt. Dapttin®, ein „lösliches“ Kaolin, diente als Referenzsubstanz für die Kaolinsuspension. Durch Innovin® (= tissue factor) wurde die Aktivierung der extrinsischen Gerinnung ausgelöst. In Voruntersuchungen wurde die optimale Konzentration des jeweiligen Aktivators ermittelt, um eine zu schnelle und nicht überschaubare Gerinnungsaktivierung zu verhindern. Das maximale Ausmaß der Prothrombinaktivierung sollte frühestens nach 2 Stunden erreicht werden, da die Durchführung der Untersuchungen über einen Zeitraum von 5 Stunden geplant war.

Die Aktivatoren wurden in folgenden Verhältnissen verdünnt:

Kaolin :	1:50	Innovin®:	1:5	Dapttin®:	1:5
	1:100		1:10		1:10
	1:250		1:20		1:20
	1:500				1:50

Jeweils 50 µl der verdünnten Aktivatoren wurden in Röhrchen aus Polypropylen vorgelegt, anschließend mit 900 µl hirudin-antikoagulierte Plasma und 50 µl NaCl (0,154 M) versetzt und bei 37 °C inkubiert. Die Thrombinbildung wurde über die Bestimmung von Prothrombinfragment F1+2 erfasst. Die Zunahme von Prothrombinfragment F1+2 entspricht der Menge an gebildetem aktivem Thrombin.

Die Ergebnisse der Voruntersuchungen sind in den Abbn. 18, 19 und 20 dargestellt. Kriterium für die „optimale“ Konzentration war, dass die verwendete Aktivatorkonzentration eine allmähliche Bildung von aktivem Thrombin bewirkte. Die vollständige Aktivierung sollte nach 2-3 h erreicht werden und zu einer Konzentration von 1000 bis 2000 nM F1+2 führen. Diese Bedingungen waren bei einem Verdünnungsverhältnis von 1:250 für Kaolin, 1:5 für Innovin® und 1:50 für Dapttin® erfüllt (Abbn. 18, 19 und 20).

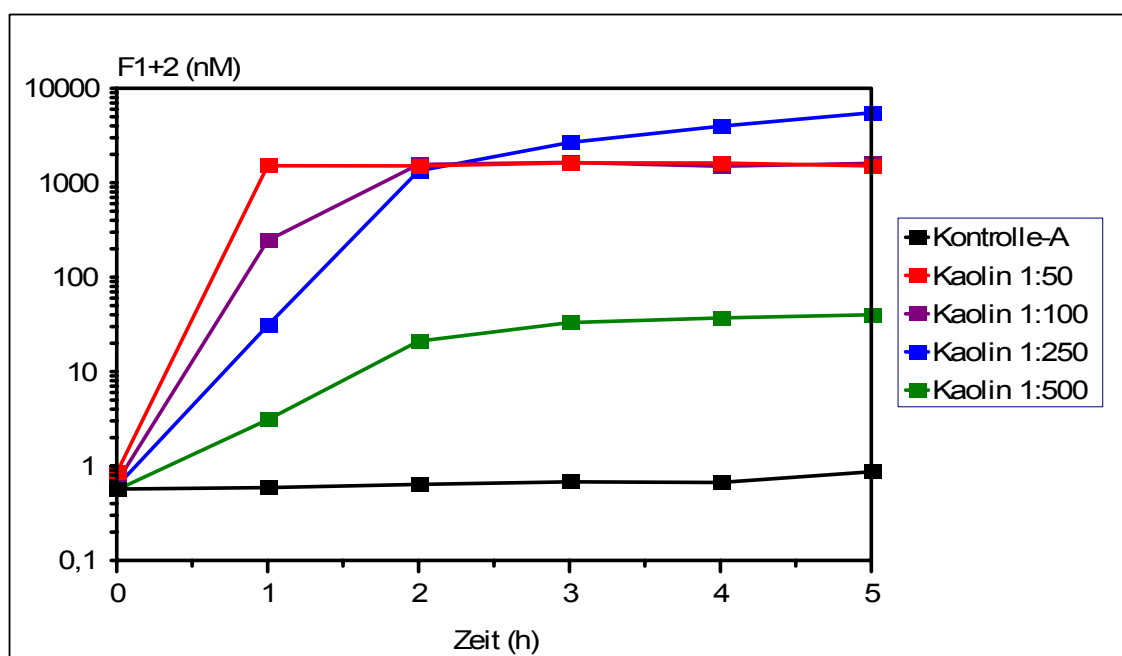


Abb. 18: Bildung von Thrombin in hirudin-antikoagulierte Plasma nach Aktivierung mit verschiedenen Verdünnungen von Kaolin
Kontrolle-A: hirudin-antikoagulierte Plasma ohne Kaolin
n = 1

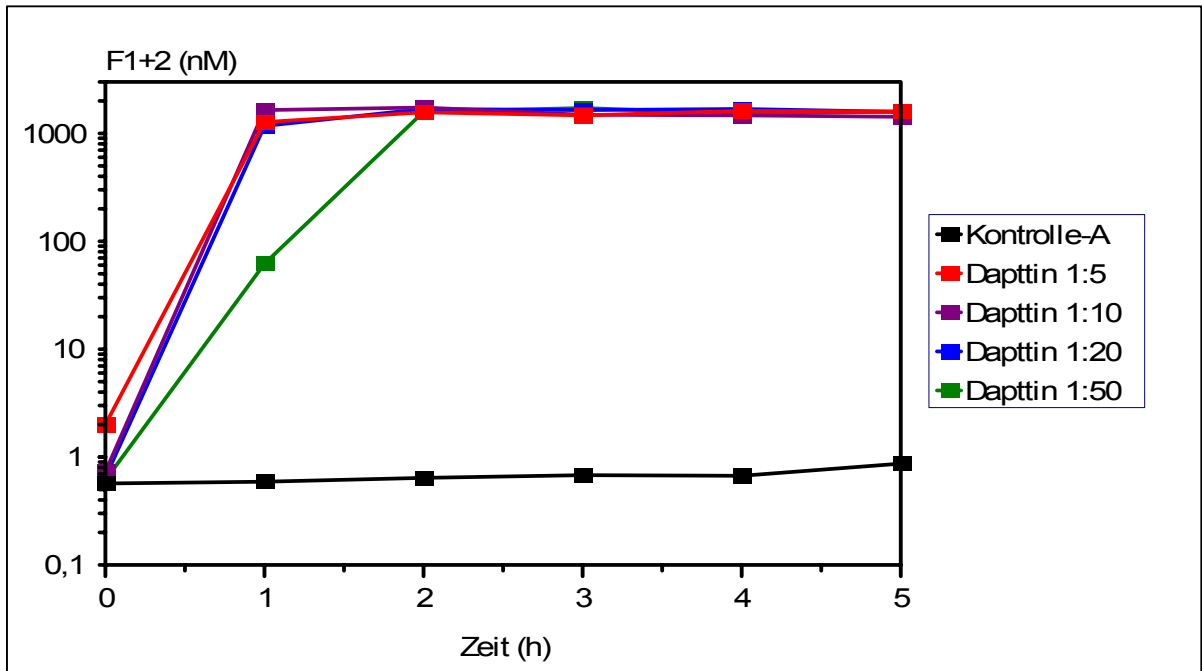


Abb. 19: Bildung von Thrombin in hirudin-antikoagulierte Plasma nach Aktivierung mit verschiedenen Verdünnungen von Dapttin®
Kontrolle-A: hirudin-antikoagulierte Plasma ohne Dapttin®
n = 1

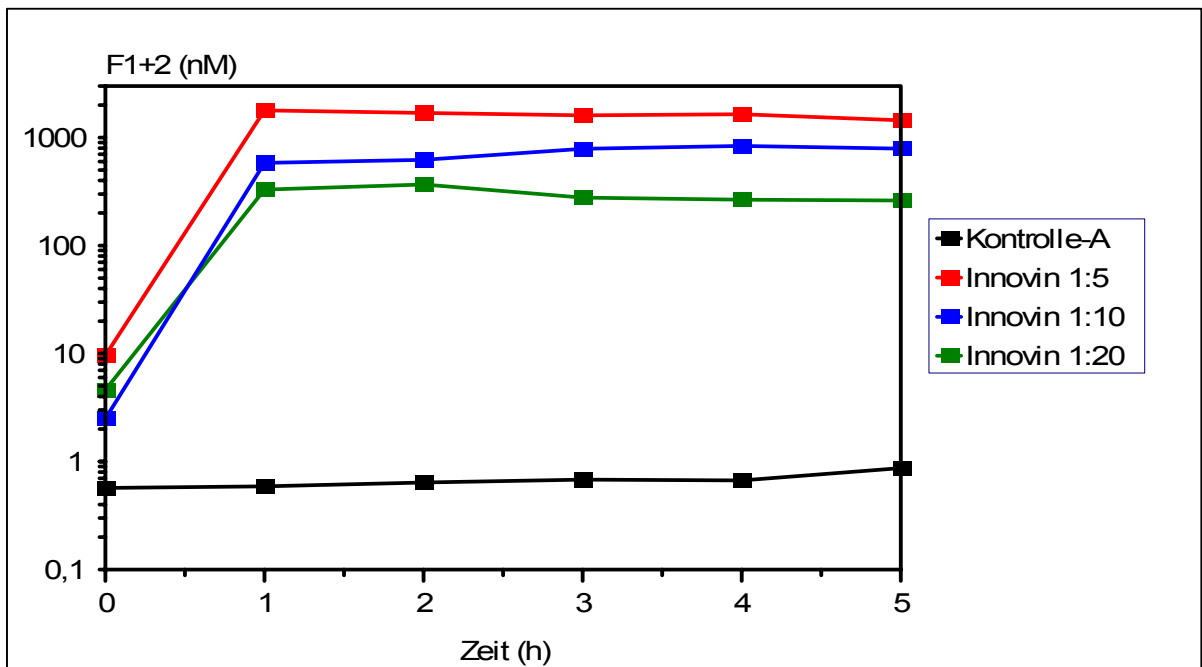


Abb. 20: Bildung von Thrombin in hirudin-antikoagulierte Plasma nach Aktivierung mit verschiedenen Verdünnungen von Innovin®
Kontrolle-A: hirudin-antikoagulierte Plasma ohne Innovin®
n = 1

Aus diesen Ergebnissen wurde die Versuchsanordnung für die weiterführenden Untersuchungen abgeleitet: Die Aktivatoren wurden jeweils in ein Polypropylen-Röhrchen in folgenden Verdünnungsverhältnissen vorgelegt: Kaolin 1:250, Innovin® 1:5 und Dapttin® 1:50. Für die Bestimmung der maximalen Aktivität (100 %-Wert) wurde Kaolin im Verhältnis 1:50 und Dapttin® im Verhältnis 1:10 verdünnt. Innovin® wurde unverdünnt eingesetzt (Kap. 4.1.4). In allen Abbildungen entspricht die maximale Aktivität bzw. der 100 %-Wert der maximal aktivierbaren Menge von Prothrombin (1000-2000 nM). Diese Menge entspricht der mittleren Plasmakonzentration von Prothrombin, die Mann (1976) mit 1300 nM angibt.

Bei Einsatz von Kaolin als Aktivator wurden die in den Polypropylenröhrchen vorgelegten Verdünnungen für 15 min bei Raumtemperatur im Ultraschallbad behandelt, um eine optimale Suspension zu erreichen. Anschließend wurden der Inhibitor und das hirudin-antikoagulierte Plasma hinzugegeben. Die Ansätze wurden bei 37 °C inkubiert. Zu bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen und sofort bei -20°C tiefgefroren. Die Thrombinbildung wurde anhand der Freisetzung von Prothrombinfragment F1+2 bestimmt und in allen Abbildungen entsprechend dargestellt. Aus den Einzelwerten der Plasmen verschiedener Spender wurden Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) berechnet.

In den nachfolgenden Untersuchungen diente ausschließlich Kaolin (1:250) als Aktivator, weil für die Beurteilung der Effizienz der Frühphaseninhibitoren die Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems erforderlich war.

5.1.2 Einfluss von Hemmstoffen der Frühphase der Gerinnung auf die Thrombinbildung

5.1.2.1 Einfluss von PK-Hemmstoffen auf die Thrombinbildung

Die Inhibitoren CJ-1423 und CJ-1424 sind relativ spezifische PK-Hemmstoffe. Die Inhibitorkonstanten K_i für andere Enzyme der Frühphase liegen ca. 1000fach höher (Tabelle 1). Die Endkonzentrationen in den Aktivierungsansätzen betrugen 100 μ M, 10 μ M und 1 μ M.

Die Abbn. 21 und 22 zeigen, dass beide Inhibitoren die Thrombinbildung bei einer Konzentration von 100 μ M vollständig hemmen. Bei einer Konzentration von 10 μ M

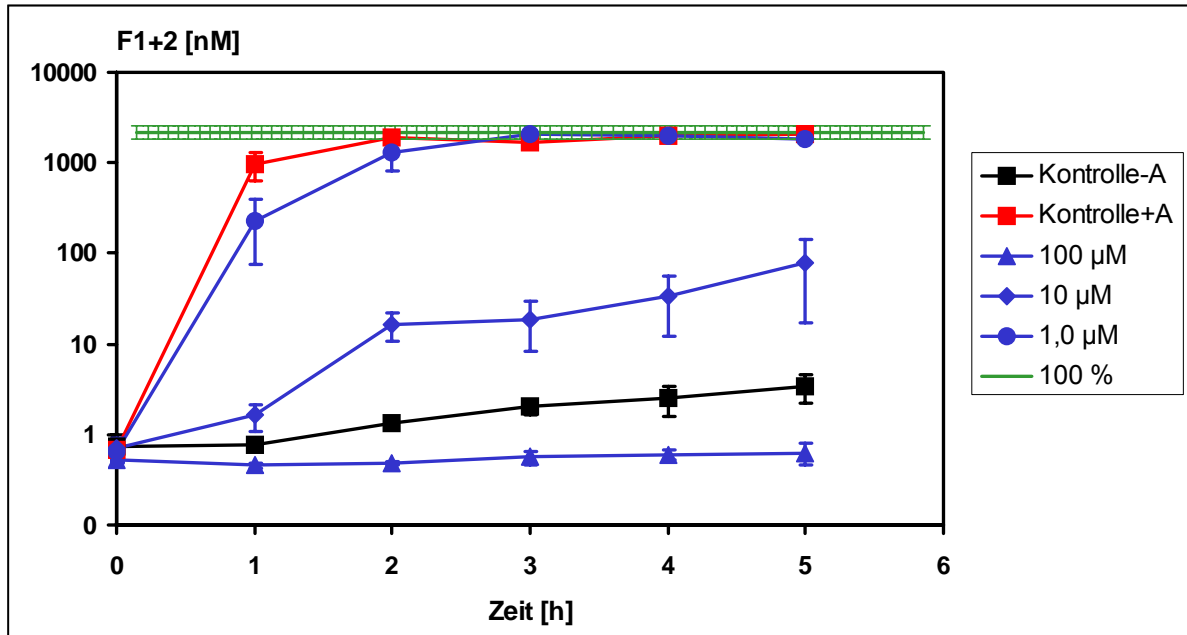


Abb. 21: Beeinflussung der Thrombinbildung in hirudin-antikoagulierte Plasma nach Aktivierung mit Kaolin durch den PK-Hemmstoff CJ-1423
 Kontrolle-A: hirudin-antikoagulierte Plasma ohne Kaolin
 Kontrolle+A: hirudin-antikoagulierte Plasma mit Kaolin
 Mittelwerte \pm SD, n = 3

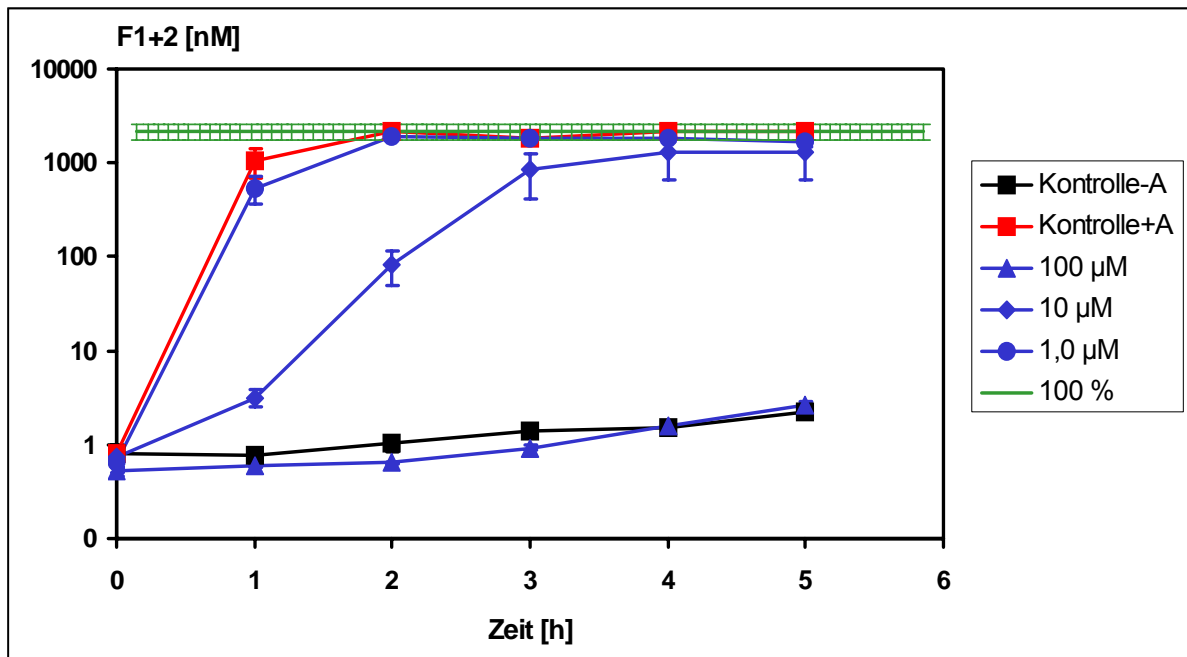


Abb. 22: Beeinflussung der Thrombinbildung in hirudin-antikoagulierte Plasma nach Aktivierung mit Kaolin durch den PK-Hemmstoff CJ-1424
 Kontrolle-A: hirudin-antikoagulierte Plasma ohne Kaolin
 Kontrolle+A: hirudin-antikoagulierte Plasma mit Kaolin
 Mittelwerte \pm SD, n = 3

war noch eine wirksame Hemmung zwischen 50 % - 90 % möglich, während bei einer Konzentration von 1 μM keine Hemmung mehr erreicht wurde.

Der Vergleich der beiden Inhibitoren untereinander zeigt, dass die Hemmwirkung von CJ-1423 etwas stärker ist.

5.1.2.2 Einfluss eines F Xla-Hemmstoffes auf die Thrombinbildung

Mit CJ-675 wurde ein relativ spezifischer F Xla-Hemmstoff in Endkonzentrationen von 100 μM , 10 μM , 1 μM und 0,1 μM im hirudin-antikoagulierten Plasma eingesetzt. Dieser Inhibitor bewirkte schon bei einer Konzentration von 10 μM eine vollständige Hemmung der Thrombinbildung (Abb. 23). Bei einer Konzentration von 1 μM wurde die Thrombinbildung noch zu ca. 50 % gehemmt. Eine Konzentration von 0,1 μM verursachte keine Hemmung mehr. CJ-675 ist deutlich wirksamer als die PK-Hemmstoffe CJ-1423 und CJ-1424 (Tabelle 2).

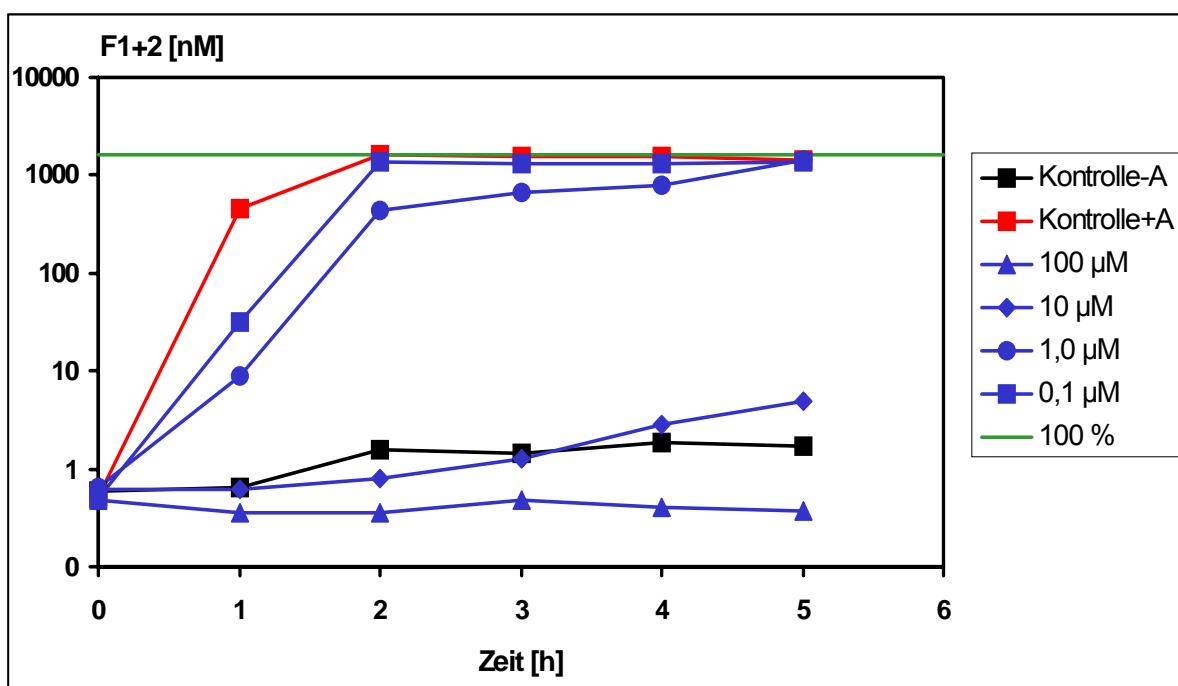


Abb. 23: Beeinflussung der Thrombinbildung in hirudin-antikoaguliertem Plasma nach Aktivierung mit Kaolin durch den F Xla-Hemmstoff CJ-675
 Kontrolle-A: hirudin-antikoaguliertes Plasma ohne Kaolin
 Kontrolle+A: hirudin-antikoaguliertes Plasma mit Kaolin
 Mittelwerte, n = 2

5.1.2.3 Einfluss eines F XIIa-Hemmstoffes auf die Thrombinbildung

CJ-1408 ist ein Hemmstoff, der im Vergleich zu den zuvor untersuchten Verbindungen F XIIa deutlich wirksamer hemmt. CJ-1408 wurde in den Endkonzentrationen 100 μM , 10 μM und 1 μM im hirudin-antikoagulierten Plasma untersucht. Abb. 24 zeigt, dass CJ-1408 bei einer Konzentration von 100 μM eine vollständige Hemmung der Thrombinbildung hervorruft. Bei einer Konzentration von 10 μM wird die Thrombinbildung noch teilweise gehemmt (50 % - 90 %). Erst bei einer Konzentration von 1 μM ist die Hemmung aufgehoben. Diese Daten verdeutlichen, dass CJ-1408 eine ähnliche Wirksamkeit wie die PK-Inhibitoren CJ-1423 und CJ-1424 aufweist (Tabelle 2).

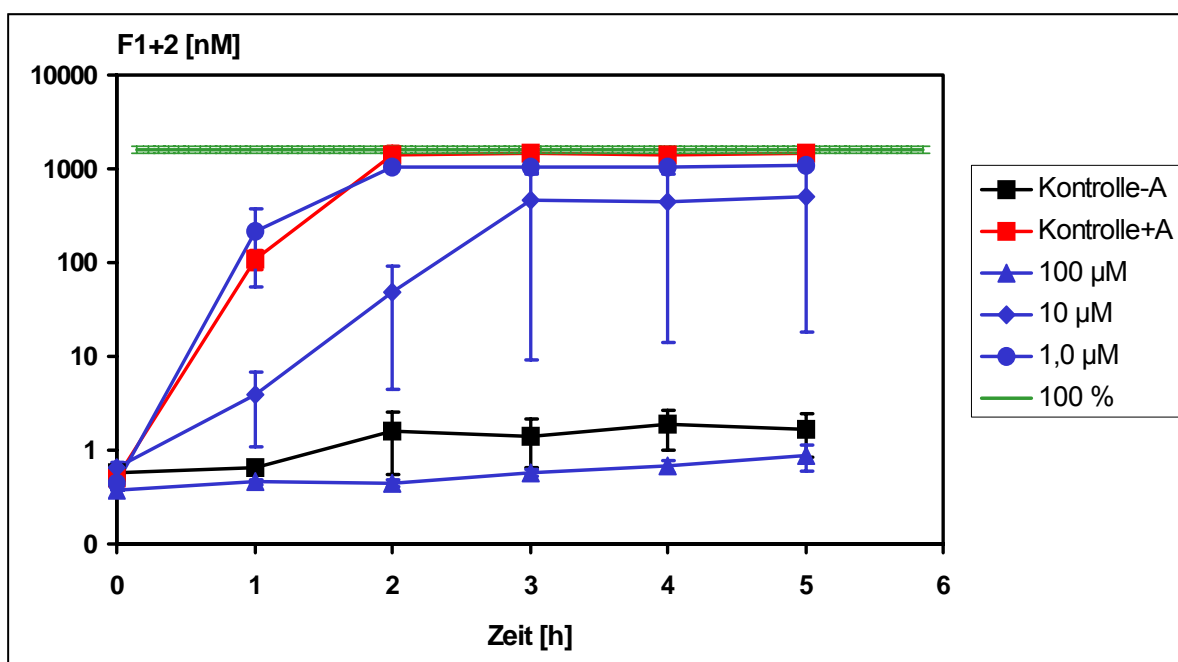


Abb. 24: Beeinflussung der Thrombinbildung in hirudin-antikoaguliertem Plasma nach Aktivierung mit Kaolin durch den F XIIa-Hemmstoff CJ-1408
 Kontrolle-A: hirudin-antikoaguliertes Plasma ohne Kaolin
 Kontrolle+A: hirudin-antikoaguliertes Plasma mit Kaolin
 Mittelwerte \pm SD, n = 3

Tabelle 2: Wirksamkeit von Hemmstoffen der Frühphasenenzyme auf die Hemmung der Thrombinbildung

Inhibitor	Hemmung von	EC ₁₀₀ (µM)	EC ₀ (µM)
CJ-1423	PK	100	1
CJ-1424	PK	100	1
CJ-675	F Xla	10	0,1
CJ-1408	F Xlla	100	1

EC₁₀₀ = Inhibitorkonzentration, die zur Reduzierung der Thrombinbildung auf < 0,1 % notwendig ist.

EC₀ = Inhibitorkonzentration, die nicht in der Lage ist, die Thrombinbildung zu unterdrücken

Die bisherigen Ergebnisse der Untersuchungen mit Inhibitoren der Frühphase sind in Tabelle 2 dargestellt. Tabelle 2 verdeutlicht, dass die Hemmung von F Xla effektiver ist als eine Hemmung von PK oder F Xlla. In den folgenden Untersuchungen wurden deshalb Inhibitoren eingesetzt, die eine kombinierte Hemmung der verschiedenen Frühphasenenzyme bewirken.

5.1.2.4 Thrombinbildung bei gleichzeitiger Hemmung von PK und F Xla

CJ-1714 ist ein Inhibitor, der sowohl PK als auch F Xla hemmt. Er wurde in Endkonzentrationen von 10 µM, 1 µM und 0,1 µM eingesetzt. Die Ergebnisse der Bestimmung von Prothrombinfragment F1+2 sind in Abb. 25 dargestellt. Es zeigte sich, dass der Inhibitor bei einer Konzentration von 10 µM eine vollständige Hemmung der Thrombinbildung bewirkt, jedoch bei Konzentrationen von 1 µM und 0,1 µM keine Hemmung mehr erfolgt.

Damit ist dieser Inhibitor deutlich wirksamer als die PK-Hemmstoffe CJ-1423 und CJ-1424, aber nicht wirksamer als der F Xla-Hemmstoff CJ-675 (Tabelle 3).

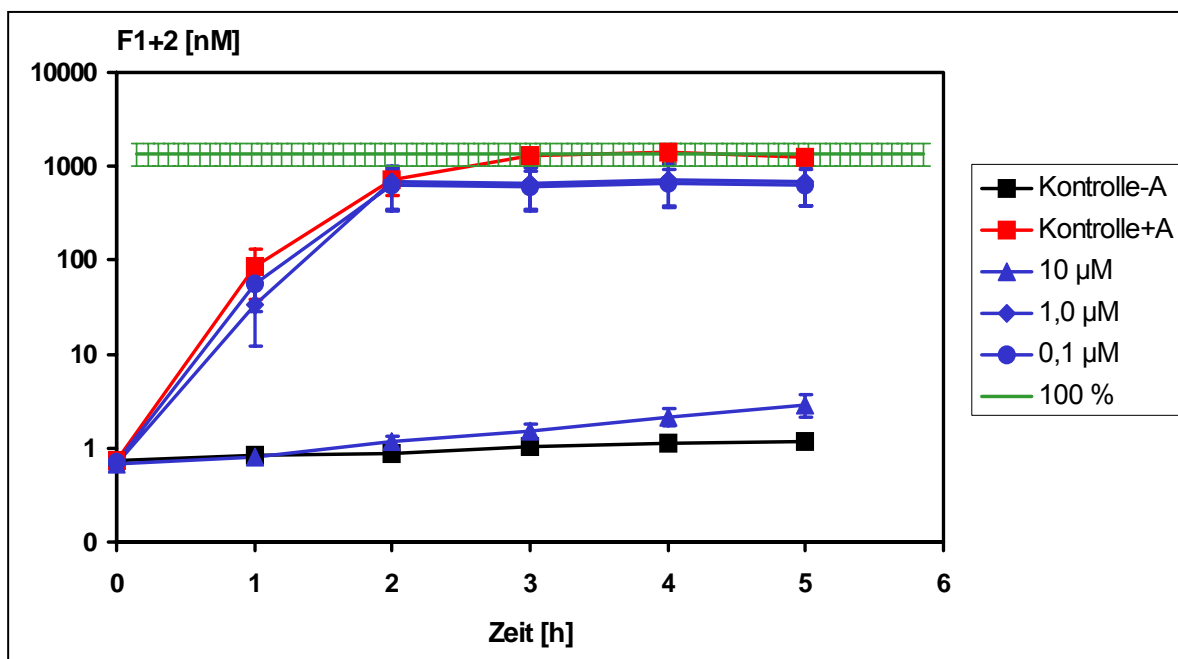


Abb. 25: Beeinflussung der Thrombinbildung in hirudin-antikoagulierte Plasma nach Aktivierung mit Kaolin durch den PK/F XIa-Hemmstoff CJ-1714
 Kontrolle-A: hirudin-antikoagulierte Plasma ohne Kaolin
 Kontrolle+A: hirudin-antikoagulierte Plasma mit Kaolin
 Mittelwerte \pm SD, n = 3

5.1.2.5 Thrombinbildung bei gleichzeitiger Hemmung von PK, F XIa und F XIIa

In diesen Experimenten wurde CJ-1712 als Inhibitor in Endkonzentrationen von 10 μ M, 1 μ M und 0,1 μ M verwendet. Die Ergebnisse zeigt die Abb. 26. Eine Inhibitor-konzentration von 10 μ M bewirkte eine vollständige Hemmung der Thrombinbildung. Bei niedrigeren Konzentrationen konnte noch eine wirksame Hemmung von 99 % (1 μ M) bzw. 50 % (0,1 μ M) erreicht werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die gleichzeitige Hemmung der 3 Frühphasenenzyme PK, F XIa und F XIIa den größten Effekt bezüglich der Hemmung der Thrombinbildung hat (Tabelle 3).

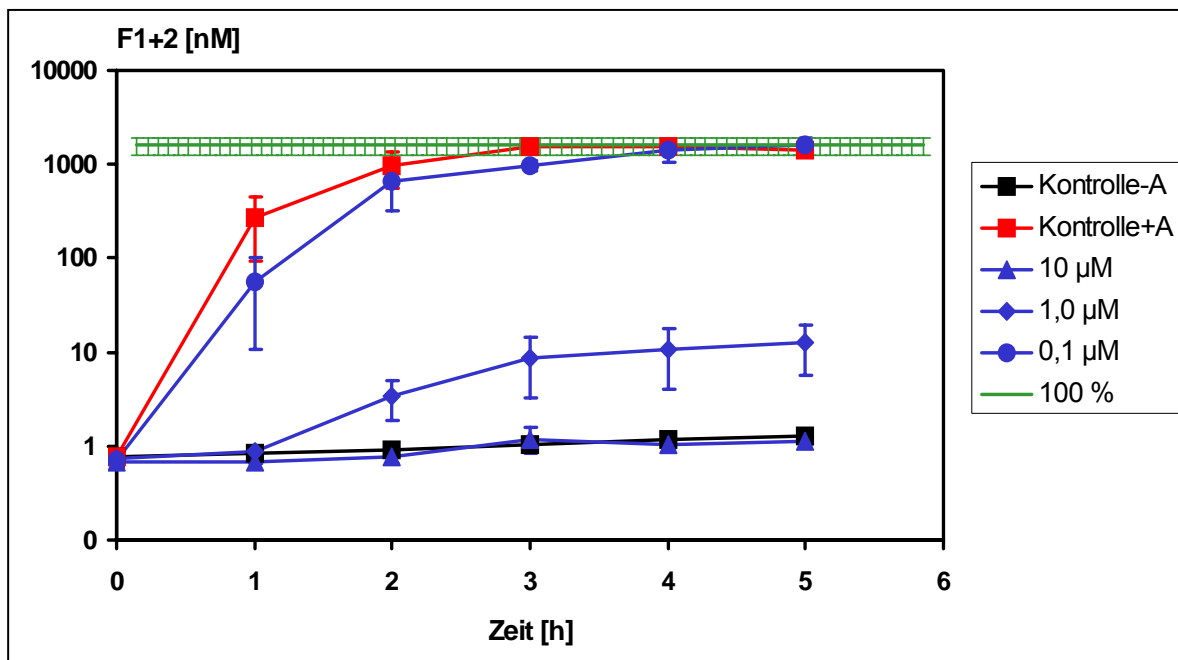


Abb. 26: Beeinflussung der Thrombinbildung in hirudin-antikoagulierte Plasma nach Aktivierung mit Kaolin durch den PK-F XIa-F XIIa-Hemmstoff CJ-1712
 Kontrolle–A: hirudin-antikoagulierte Plasma ohne Kaolin
 Kontrolle+A: hirudin-antikoagulierte Plasma mit Kaolin
 Mittelwerte \pm SD, n = 3

Tabelle 3: Wirksamkeit von Hemmstoffen der Frühphasenenzyme auf die Hemmung der Thrombinbildung

Inhibitor	Hemmung von	EC ₁₀₀ (µM)	EC ₀ (µM)
CJ-1714	PK + F XIa	10	1
CJ-1712	PK + F XIa + FXIIa	10	0,1
CJ-1423	PK	100	1
CJ-1424	PK	100	1
CJ-675	F XIa	10	0,1

EC₁₀₀ = Inhibitorkonzentration, die zur Reduzierung der Thrombinbildung auf < 0,1 % notwendig ist.

EC₀ = Inhibitorkonzentration, die nicht in der Lage ist, die Thrombinbildung zu unterdrücken.

5.1.3 Thrombinbildung bei Hemmung der Frühphasenenzyme PK, F XIa und F XIIa sowie von F Xa

In weiterführenden Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob neben der Hemmung der Frühphasenenzyme eine zusätzliche Hemmung von F Xa die Thrombinbildung nach intrinsischer Aktivierung mit Kaolin stärker beeinflusst. Die entsprechenden Inhibitoren CJ-1703a und CJ-1708 wurden in Endkonzentrationen von 1 μM , 0,1 μM und 0,01 μM eingesetzt. Beide Verbindungen hemmen die Thrombinbildung vollständig bei einer Konzentration von 1 μM (Abb. 27 und 28). Bei CJ-1703a führt eine Konzentration von 0,1 μM noch zu einer Hemmung von 90% (Abb. 27). Bei CJ-1708 erreicht dieselbe Konzentration eine Hemmung von 99 % (Abb. 28). Durch CJ-1703a und CJ-1708 wird bei einer Konzentration von 0,01 μM die Thrombinbildung nicht mehr verhindert.

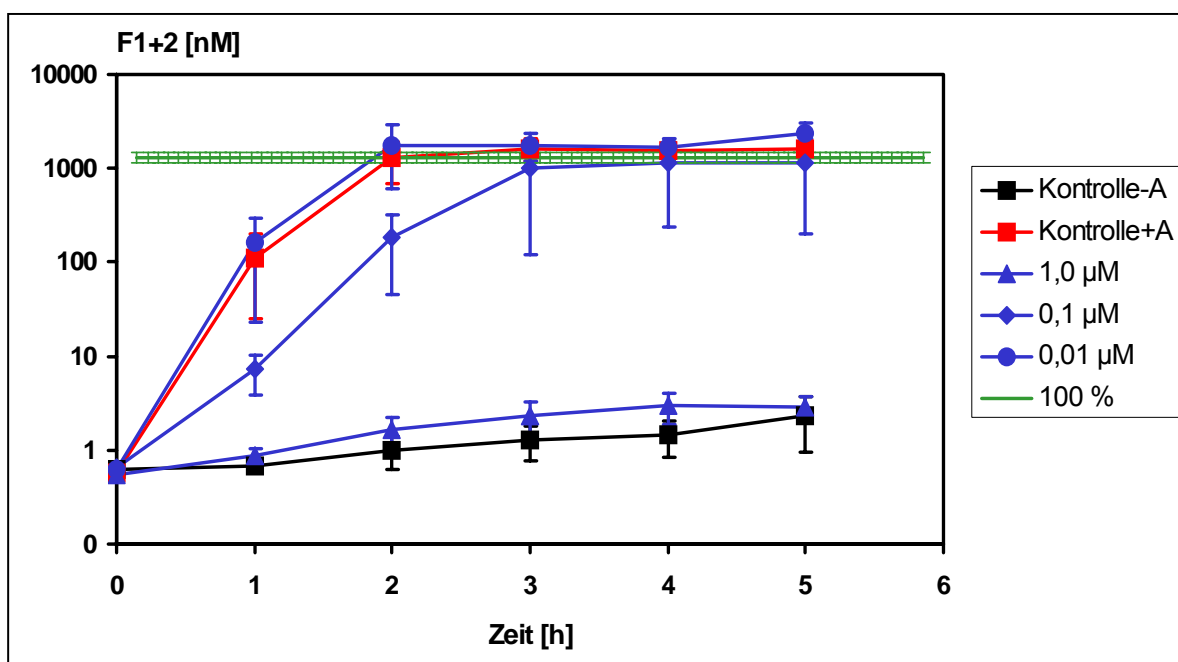


Abb. 27: Beeinflussung der Thrombinbildung in hirudin-antikoaguliertem Plasma nach Aktivierung mit Kaolin durch den Hemmstoff CJ-1703a
 Kontrolle-A: hirudin-antikoaguliertes Plasma ohne Kaolin
 Kontrolle+A: hirudin-antikoaguliertes Plasma mit Kaolin
 Mittelwerte \pm SD, n = 3

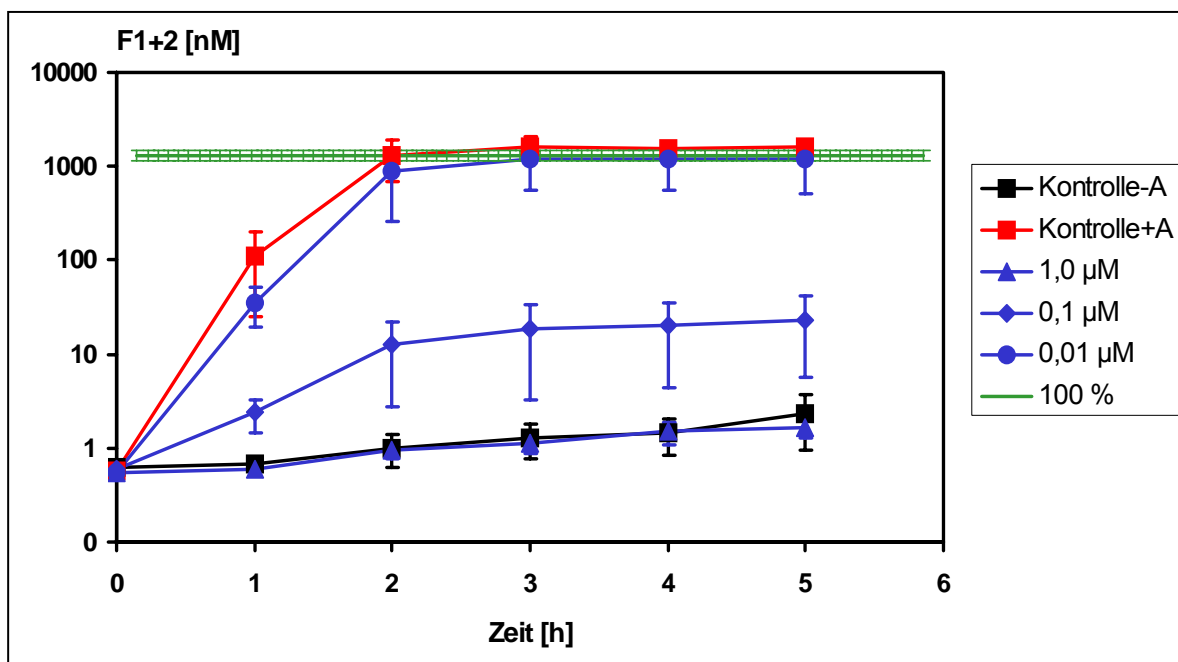


Abb. 28: Beeinflussung der Thrombinbildung in hirudin-antikoagulierte Plasma nach Aktivierung mit Kaolin durch den Hemmstoff CJ-1708
 Kontrolle–A: hirudin-antikoagulierte Plasma ohne Kaolin
 Kontrolle+A: hirudin-antikoagulierte Plasma mit Kaolin
 Mittelwerte \pm SD, n = 3

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine zusätzliche Hemmung von F Xa die Effizienz der Inhibitoren deutlich erhöht. Vergleicht man die Hemmwirkung beider Verbindungen (K_i -Werte in Tabelle 1), ist zu erkennen, dass CJ-1708 eine höhere Affinität zu PK, F XIa und F Xa besitzt. Das drückt sich allerdings nicht in einer deutlich stärkeren Beeinflussung der Thrombinbildung aus. Offenbar ist bei beiden Verbindungen die gute Hemmwirkung gegenüber F Xa ausreichend, um bei einer Konzentration von 1 μ M die Thrombinbildung vollständig zu unterdrücken.

5.1.4 Thrombinbildung bei selektiver Hemmung von F Xa

In den zuvor besprochenen Versuchen hat sich gezeigt, dass insbesondere solche Verbindungen die kaolin-induzierte Thrombinbildung effektiv verhindern können, die neben einer Hemmung der Enzyme der Frühphase auch F Xa inhibieren. In den folgenden Untersuchungen sollte unter Verwendung der F Xa-Hemmstoffe CJ-641 und CJ-1332 festgestellt werden, welche Rolle die F Xa-Hemmung unter den gegebenen Bedingungen spielt.

Abb. 29 zeigt, dass bei einer Endkonzentration von $\geq 0,1 \mu\text{M}$ die Thrombinbildung durch CJ-641 vollständig verhindert wird. Bei einer Konzentration von $0,01 \mu\text{M}$ erfolgte keine Hemmung der Thrombinbildung mehr.

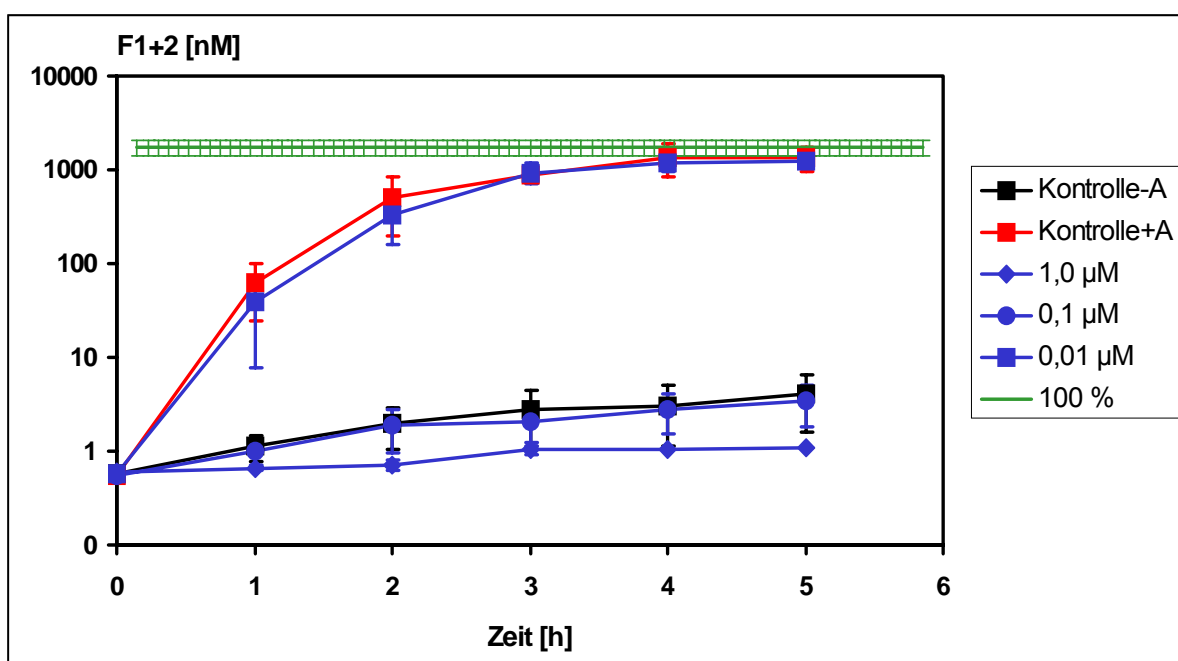


Abb. 29: Beeinflussung der Thrombinbildung in hirudin-antikoaguliertem Plasma nach Aktivierung mit Kaolin durch den F Xa-Hemmstoff CJ-641
 Kontrolle-A: hirudin-antikoaguliertes Plasma ohne Kaolin
 Kontrolle+A: hirudin-antikoaguliertes Plasma mit Kaolin
 Mittelwerte \pm SD, n = 3

Mit dem zweiten selektiven F Xa-Hemmstoff CJ-1332 wurden identische Ergebnisse erhalten (Abb. 30).

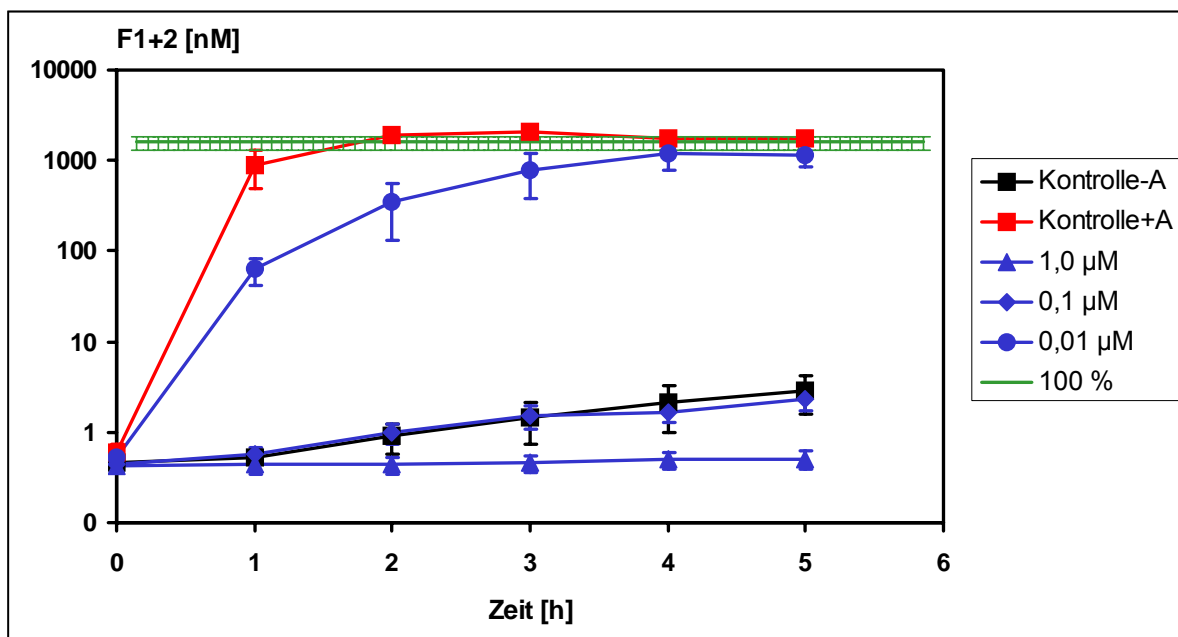


Abb. 30: Beeinflussung der Thrombinbildung in hirudin-antikoaguliertem Plasma nach Aktivierung mit Kaolin durch den F Xa-Hemmstoff CJ-1332
 Kontrolle-A: hirudin-antikoaguliertes Plasma ohne Kaolin
 Kontrolle+A: hirudin-antikoaguliertes Plasma mit Kaolin
 Mittelwerte \pm SD, n = 3

Diese Befunde ergeben, dass unter den vorliegenden Bedingungen die F Xa-Hemmung sehr entscheidend und offenbar ausreichend ist. CJ-641 und CJ-1332 sind effektiver als CJ-1708 (Tabelle 4). Dabei ist interessant, dass CJ-1332 eine 10fach stärkere Hemmwirkung gegenüber F Xa besitzt als CJ-641 (Tabelle 1). Die Differenz in den K_i -Werten spiegelt sich nicht in der Effizienz der Hemmung der Thrombinbildung wider, was möglicherweise auf die hohen Konzentrationsstufen zurückzuführen ist.

Alle in den experimentellen Untersuchungen eingesetzten Inhibitoren weisen auf Grund ihrer spezifischen Hemmaktivität gegenüber den geprüften Enzymen eine sehr unterschiedliche Wirksamkeit bezüglich der Hemmung der Thrombinbildung im Hirudinplasma auf. In Tabelle 4 sind die Inhibitorkonzentrationen (EC_{100}) zusammengefasst, bei denen die Thrombinbildung vollständig unterbunden ist, d.h. weniger als 0,1 % des vorhandenen Prothrombins aktiviert wird. Bei einer Konzentration von ca. 2000 nM Prothrombin entspricht das der Bildung von < 2 nM Thrombin. Diese effektive Hemmung der Aktivierung von Prothrombin ist notwendig, da schon

Thrombinkonzentrationen von 10 – 20 nM zur Gerinnung führen. Die Tabelle zeigt, dass nur Verbindungen mit starker F Xa-Hemmung in der Lage sind, bei submikromolaren Konzentrationen (0,1 µM bis 1 µM) eine Gerinnungsaktivierung vollständig zu verhindern. Diese Konzentrationen entsprechen den therapeutisch angestrebten Blutspiegeln für Inhibitoren als Antikoagulanzen.

Tabelle 4: Wirksamkeit aller eingesetzten Inhibitoren auf die Hemmung der Thrombinbildung

Inhibitor	Effektive Hemmung von	EC ₁₀₀ (µM)	EC ₀ (µM)
CJ-1423	PK	100	1
CJ-1424	PK	100	1
CJ-675	F XIa	100	0,1
CJ-1408	F XIIa	100	1
CJ-1714	PK, F XIa	10	1
CJ-1712	PK, F XIa, F XIIa	10	0,1
CJ-1703a	PK, F XIa, F XIIa, F Xa	1	0,01
CJ-1708	PK, F XIa, F XIIa, F Xa	1	0,01
CJ-641	F Xa	1	0,01
CJ-1332	F Xa	0,1	0,01

EC₁₀₀ = Inhibitorkonzentration, die zur Reduzierung der Thrombinbildung auf < 0,1 % notwendig ist.

EC₀ = Inhibitorkonzentration, die nicht in der Lage ist, die Thrombinbildung zu unterdrücken

Um festzustellen, ob die Hemmwirkung gegen PK, F XIa und F XIIa am Gesamteffekt beteiligt ist, wurden weitere Untersuchungen unter Verwendung anderer Aktivatoren durchgeführt.

5.1.5 Beeinflussung der Thrombinbildung durch Hemmstoffe bei Einsatz anderer Aktivatoren

5.1.5.1 Einfluss von Hemmstoffen auf die Thrombinbildung nach Aktivierung mit Innovin®

In den Untersuchungen erfolgte eine Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems über Innovin® (1:5). Der F Xa-Hemmstoff CJ-1332 wurde in den gleichen Endkonzentrationen eingesetzt wie bei Aktivierung mit Kaolin. Die Ergebnisse sind in Abb. 31 dargestellt. Eine Konzentration von 1 µM führte zu einer Hemmung der Thrombinbildung von 99 %. Mit Konzentrationen von 0,1 µM und 0,01 µM wurde die Thrombinbildung nicht mehr effektiv verhindert.

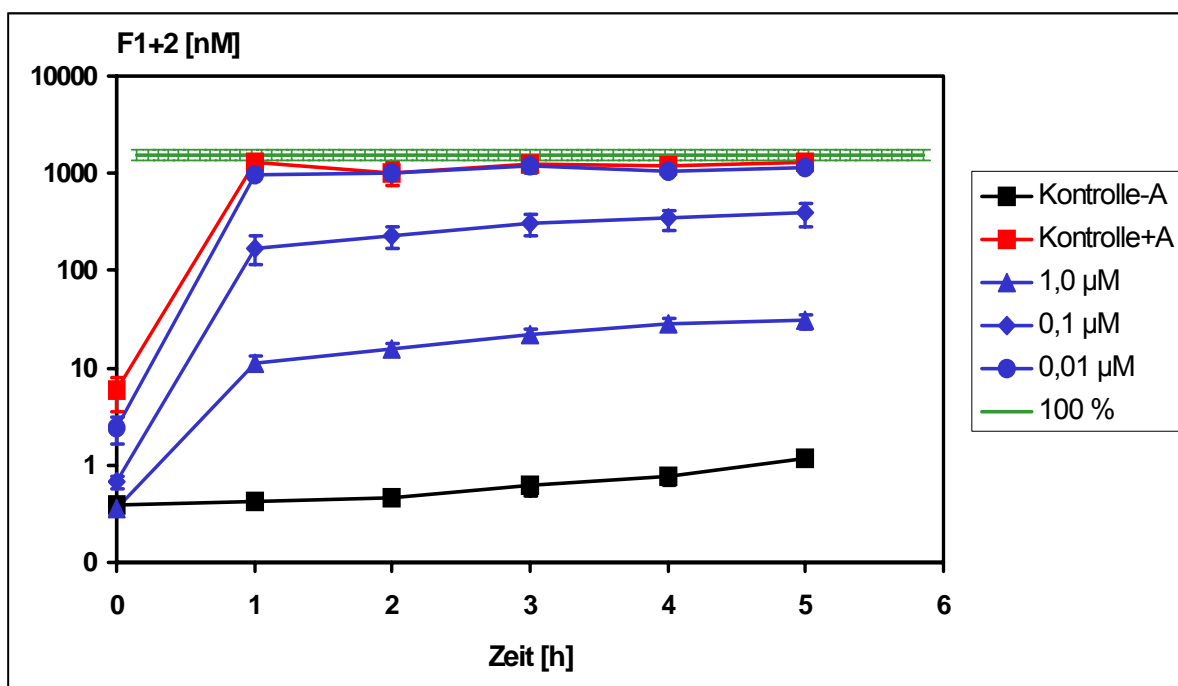


Abb. 31: Beeinflussung der Thrombinbildung in hirudin-antikoagulierem Plasma nach Aktivierung mit Innovin® durch den F Xa-Hemmstoff CJ-1332
 Kontrolle-A: hirudin-antikoagulierendes Plasma ohne Innovin®
 Kontrolle+A: hirudin-antikoagulierendes Plasma mit Innovin®
 Mittelwerte \pm SD, n = 3

CJ-1332 besitzt bei Aktivierung mit Innovin® eine deutlich geringere Wirksamkeit als bei Aktivierung mit Kaolin. Offenbar erfolgt die Bildung von F Xa über den intrinsischen Weg langsamer und in geringerem Ausmaß, so dass eine effektivere Hemmung der Thrombinbildung durch F Xa-Inhibitoren erreicht wird.

Neben dem F Xa-Hemmstoff CJ-1332 wurde CJ-1714, ein Hemmstoff gegen PK und F Xla, untersucht (100 µM, 10 µM und 1 µM) (Abb. 32). Lediglich mit einer Konzentration von 100 µM wurde die Thrombinbildung bis zu 90 % in einzelnen Versuchen gehemmt, so dass in Abb. 32 eine große Streuung erscheint. Bei Aktivierung mit Innovin® ist die Wirksamkeit von CJ-1714 in Bezug auf die Hemmung der Thrombinbildung um Faktor 100 geringer als bei CJ-1332. Dieser Unterschied bestätigt, dass bei Aktivierung des extrinsischen Weges mit Innovin® nur eine F Xa-Hemmung die Thrombinbildung erfolgreich blockieren kann.

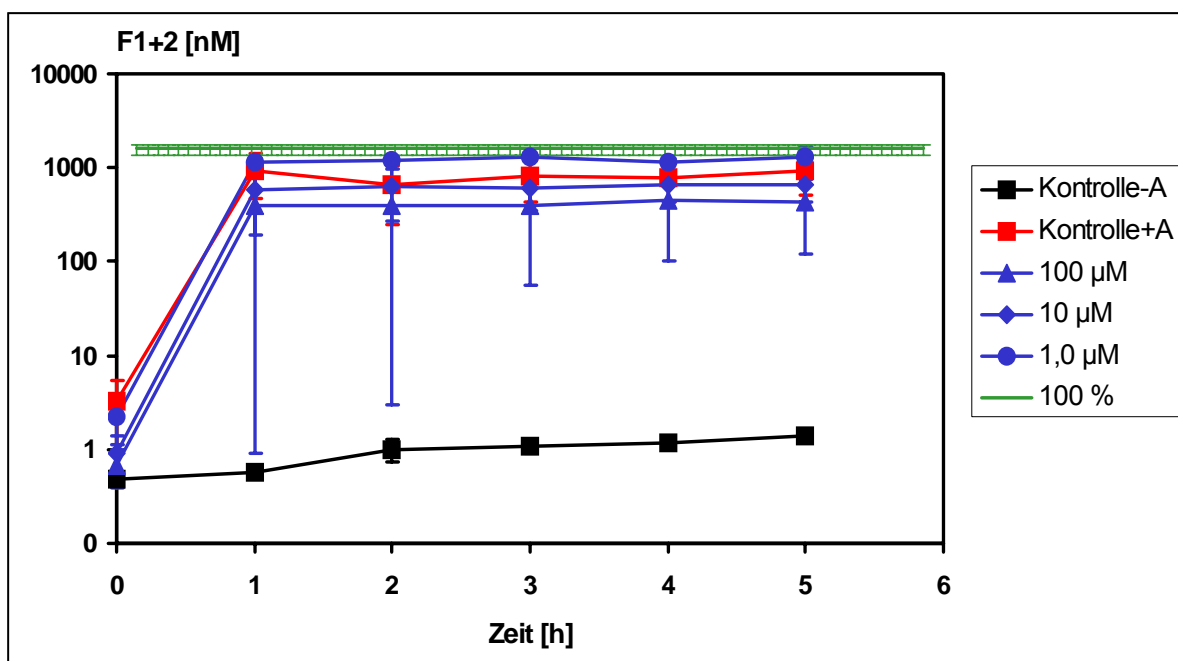


Abb. 32: Beeinflussung der Thrombinbildung in hirudin-antikoagulierte Plasma nach Aktivierung mit Innovin® durch den PK/F Xla-Hemmstoff CJ-1714
 Kontrolle-A: hirudin-antikoagulierte Plasma ohne Innovin®
 Kontrolle+A: hirudin-antikoagulierte Plasma mit Innovin®
 Mittelwerte ± SD, n = 3

5.1.5.2 Einfluss von Hemmstoffen auf die Thrombinbildung nach Aktivierung mit Dapttin®

Die folgenden Untersuchungen wurden durchgeführt, um festzustellen, ob die mit Kaolin ermittelten Ergebnisse nur auf dessen spezifischen Aktivierungsmechanismus zurückzuführen waren oder ob sie auch mit anderen Aktivatoren für die intrinsische Gerinnung reproduzierbar sind. Dafür wurde Dapttin®, das im Verhältnis 1:50 verdünnt wurde, eingesetzt.

Die Vergleichsuntersuchungen wurden mit dem PK- und F Xla-Hemmstoff CJ-1714 durchgeführt. Der Inhibitor wurde in Endkonzentrationen zwischen 100 µM und 0,1 µM eingesetzt (Abb. 33).

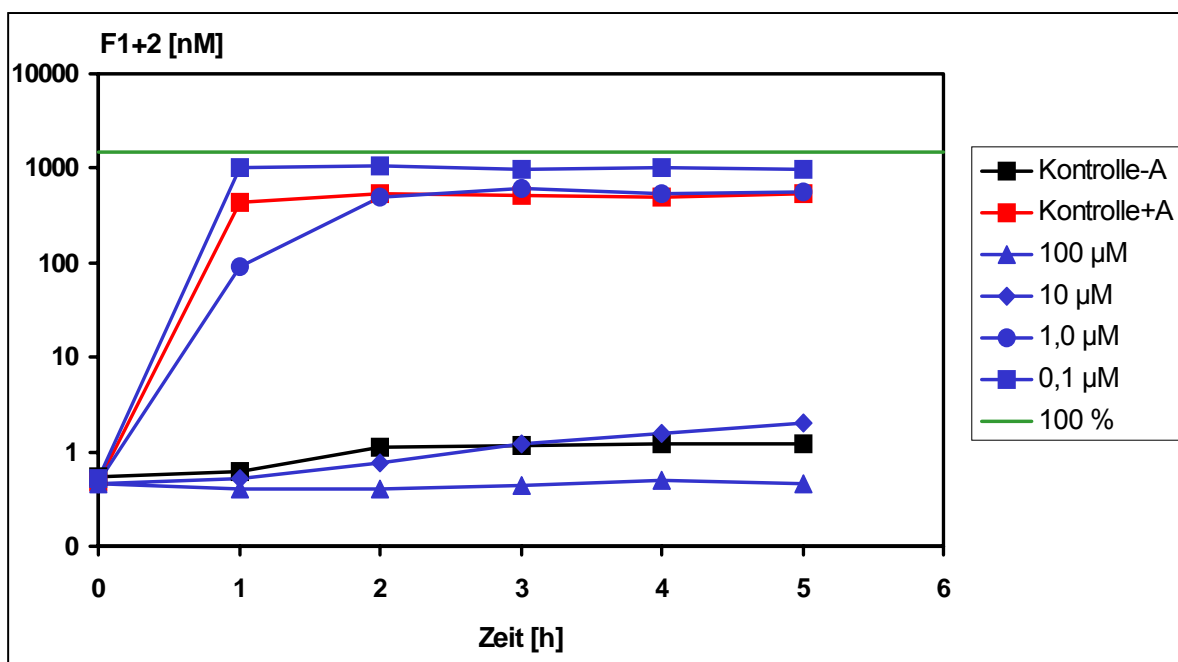


Abb. 33: Beeinflussung der Thrombinbildung in hirudin-antikoagulierte Plasma nach Aktivierung mit Dapttin® durch den PK-F Xla-Hemmstoff CJ-1714
 Kontrolle-A: hirudin-antikoagulierte Plasma ohne Dapttin®
 Kontrolle+A: hirudin-antikoagulierte Plasma mit Dapttin®
 Mittelwerte, n = 2

Abb. 33 zeigt, dass bei Aktivierung mit Dapttin® CJ-1714 in Konzentrationen ≥ 10 µM eine vollständige Hemmung der Thrombinbildung bewirkt. Dieses Ergebnis ist identisch mit den Untersuchungen, in denen Kaolin als Aktivator diente. Da beide Aktivatoren nur die intrinsische Gerinnung auslösen, ist dieses Ergebnis plausibel.

5.1.6 Antikoagulation von Vollblut mit CJ-1708

Mit dem Inhibitor CJ-1708 wurde geprüft, ob der antikoagulatv sehr wirksame Hemmstoff in der Lage ist, auch im Vollblut die Gerinnung zu verhindern.

CJ-1708 wurde im Vollblut in Endkonzentrationen von 10 μM , 1 μM und 0,1 μM eingesetzt.

Aus Abb. 34 ist zu erkennen, dass CJ-1708 die Thrombinbildung im Vollblut bei einer Konzentration von 1 μM verzögern, allerdings nicht verhindern, kann. Nach 80 min trat Gerinnselbildung auf.

Es war eine Konzentration von 10 μM notwendig, um eine Antikoagulation über mehr als 8 Stunden zu erreichen. Die Differenz zu den Untersuchungen im Hirudinplasma (siehe Kapitel 5.1.3) liegt darin begründet, dass im Vollblut auch die extrinsische Gerinnungskaskade aktiviert wird, da die zellulären Bestandteile des Blutes über TF verfügen. Aus diesem Grund muss der Inhibitor im Vollblut in mindestens 10fach höheren Konzentrationen eingesetzt werden.

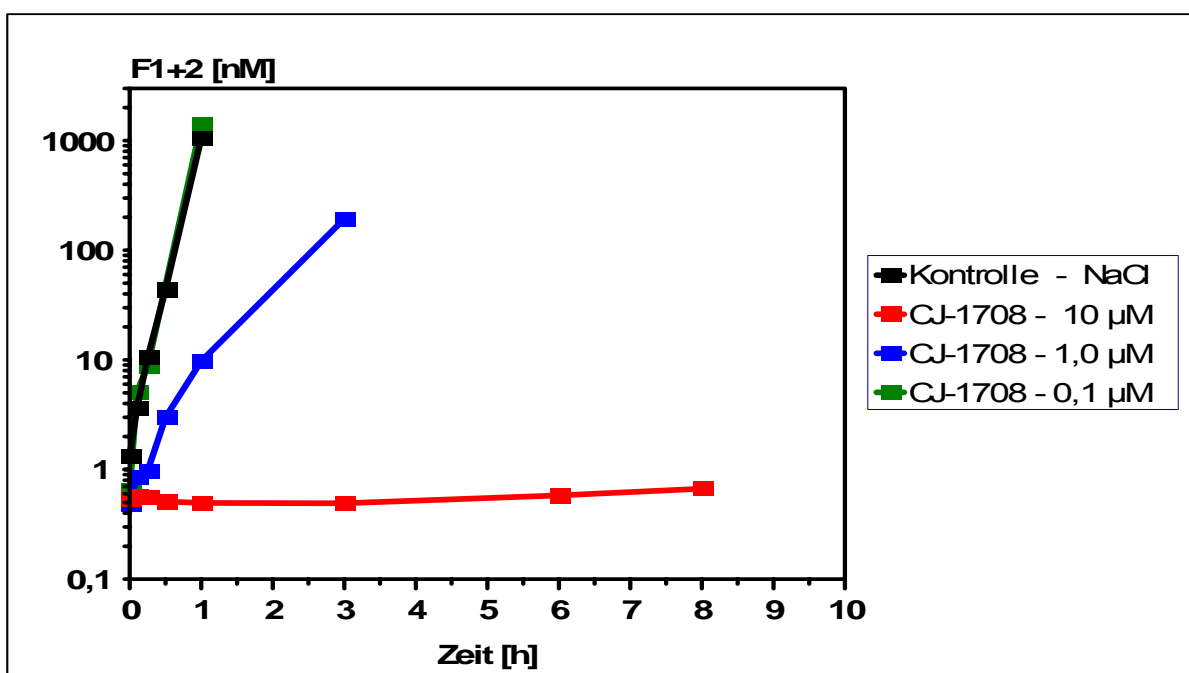


Abb. 34: Beeinflussung der Thrombinbildung im Vollblut bei Antikoagulation mit CJ-1708
n = 1

6 Diskussion

Der direkte Kontakt von Blut mit „fremden“ oder unphysiologischen Oberflächen, wie er beispielsweise bei kardiopulmonalem Bypass, Hämodialyse, bei Einsatz künstlicher Herzklappen oder Koronarendoprothesen auftritt, kann zur Gerinnungsaktivierung über den intrinsischen Weg führen (Edmunds 1993, Courtney und Forbes 1994). Bisher kommen bei diesen Eingriffen als Antikoagulanzen nur Heparin bzw. Heparinderivate und direkte Thrombinhemmstoffe zum Einsatz (Riess et al. 1995, Menear 1999, Vasquez et al. 2002, Fritsma 2004). Diese Substanzen unterbrechen die Blutgerinnung erst auf der Stufe von F Xa bzw. Thrombin. Die Kontaktaktivierung der Frühphasenenzyme PK, F XIa und F XIIa wird durch diese Antikoagulanzen jedoch nicht beeinflusst. So war die Fragestellung gerechtfertigt, ob eine frühzeitige Hemmung auf der Ebene der Frühphasenenzyme eine Gerinnungsaktivierung ebenso oder sogar noch wirksamer blockieren kann.

Ziel der Arbeit war es zu prüfen, welche Hemmspezifität ein Inhibitor besitzen muss, um effektiv die über den intrinsischen Weg ausgelöste Aktivierung der Gerinnung zu verhindern. Es sollte untersucht werden, ob Hemmstoffe der Enzyme PK, F XIa und F XIIa wirksam sind und einen Vorteil gegenüber den oben genannten Antikoagulanzen darstellen.

Für die Untersuchungen wurde hirudin-antikoaguliertes Blutplasma eingesetzt. Der gewählte Ansatz erlaubt die Gerinnungsaktivierung über alle Einzelschritte bis zur Thrombinbildung zu verfolgen. Mit den bekannten Antikoagulanzen Natrium-Zitrat und EDTA ist das nicht möglich, weil alle Ca^{2+} -abhängigen Schritte blockiert sind. Allerdings muss das Hirudinplasma immer frisch eingesetzt werden, da auch ohne Zugabe von Aktivatoren eine latente Thrombinbildung auftritt (Abb. 17). Aus diesem Grund konnte für jeden Einzelversuch nur das Plasma eines Spenders verwendet werden. Aus organisatorischen, finanziellen und ethischen Gründen war es nicht möglich, für jeden Versuch mehreren Spendern Blut zu entnehmen, um Mischplasma zu erhalten. Dabei umfasste ein Versuch 2 Inhibitoren mit jeweils 3 Konzentrationen und 3 Kontrollansätzen (mit und ohne Aktivator sowie 100% Aktivität). Es war auch notwendig, die Inhibitorkonzentrationen in Zehnerpotenzen abzustufen, um die Zahl der Einzelwerte und damit die Kosten für die immunologische F1+2-Bestimmung im Rahmen zu halten.

Um eine standardisierbare Aktivierung der Plasmen zu erreichen, wurde Kaolin als unphysiologische Oberfläche zugesetzt. Die Konzentration von Kaolin wurde so gewählt, dass die vollständige Aktivierung des im Plasma vorhandenen Prothrombins innerhalb von 3-5 Stunden erfolgte (1000-2000 nM gebildetes Thrombin bzw. Prothrombinfragment F1+2). Mit diesem Untersuchungsmodell wurde zunächst der Einfluss von Inhibitoren der Enzyme der Frühphase der Gerinnung auf die Thrombinbildung untersucht.

Die ausgewählten Inhibitoren besitzen eine gut charakterisierte inhibitorische Aktivität, jedoch waren keine Inhibitoren mit einer jeweils nur auf ein Enzym gerichteten Wirksamkeit verfügbar. Durch die Inhibitoren CJ-1423 und CJ-1424, die bevorzugt PK hemmen, wurde im Hirudinplasma die Thrombinbildung bei einer Konzentration von 100 μ M vollständig verhindert. Ein Hemmstoff mit starker Anti-FXIIa-Aktivität (CJ-1408) zeigte keine stärkere Wirksamkeit. Dagegen verhinderte ein relativ selektiver F Xla-Hemmstoff (CJ-675) die Thrombinbildung bei einer um eine Zehnerpotenz niedrigeren Konzentration vollständig. Damit scheint F Xla der effektivste Angriffspunkt zur Hemmung der Frühphasenaktivierung zu sein.

Eine gleichzeitige Hemmung der Frühphasenenzyme wurde mit den Inhibitoren CJ-1714 und CJ-1712 erreicht. Dabei war der Hemmstoff CJ-1714, der PK und F Xla sehr gut hemmt, nicht wirksamer als der F Xla-Hemmstoff CJ-675. Dieses Ergebnis bestätigt die oben angeführte Schlussfolgerung, dass insbesondere F Xla als Ziel-enzym für eine Hemmung der intrinsischen Gerinnungsaktivierung in Frage kommt. Der ausgeprägteste Effekt bezüglich der Hemmung der Thrombinbildung wurde erreicht, wenn die 3 Frühphasenenzyme gleichzeitig gehemmt wurden. So hemmte der Inhibitor CJ-1712 bei einer 10fach niedrigeren Konzentration als CJ-1714 die Thrombinbildung noch zu 99 %. Im Ergebnis könnte man annehmen, dass die zusätzliche F XIIa-Hemmung dafür verantwortlich ist. Allerdings darf nicht übersehen werden, dass dieser Inhibitor auch eine deutlich stärkere Hemmung von F Xa bewirkt (Tabelle 1). Aus diesem Grund wurden weitere Hemmstoffe mit noch stärkerer Anti-FXa-Aktivität untersucht. Tatsächlich erwiesen sich solche Hemmstoffe (CJ-1703a, CJ-1708) als deutlich wirksamer (Tabelle 4). Obwohl beide Inhibitoren entsprechend ihrer K_i -Werte (Tabelle 1) eine gute inhibitorische Wirksamkeit gegenüber allen Frühphasenenzymen aufweisen, wurde die Thrombinbildung am stärksten durch den Inhibitor mit der größten Anti-FXa-Wirkung (CJ-1708) gehemmt. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu unserer Ausgangsprämisse, nach der Hemmstoffe der

Frühphasenenzyme nach kaolin-induzierter Thrombinbildung besonders wirksam sein sollten. Offenbar besitzt F Xa im Gerinnungssystem eine deutlich prominentere Funktion bei der Potenzierung eines Gerinnungsimpulses im Vergleich zu den Frühphasenenzymen.

Die entscheidende Rolle des F Xa bei der Thrombinbildung nach intrinsischer Aktivierung wurde durch Untersuchungen mit selektiven F Xa-Inhibitoren untermauert. Die beiden geprüften F Xa-Hemmstoffe (CJ-1332, CJ-641) waren gleich bzw. etwas stärker wirksam als der Inhibitor CJ-1708, durch den zusätzlich die Frühphasenenzyme gehemmt wurden.

Die Prominenz von F Xa in Bezug auf die Thrombinbildung bei intrinsischer Gerinnungsaktivierung legte es nahe, die Effizienz der F Xa-Inhibitoren auch nach Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems zu prüfen, da F Xa an der Schnittstelle beider Systeme lokalisiert ist. CJ-1332 war nach Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems mit Innovin[®] deutlich weniger wirksam als nach Aktivierung mit Kaolin. Dieser Unterschied ist offenbar darin begründet, dass bei intrinsischer Aktivierung auf Grund der Vielzahl von Aktivierungsschritten die Bildung von F Xa relativ langsam erfolgt und zu geringeren Konzentrationen an F Xa führt. Dadurch kann die Thrombinbildung durch F Xa-Inhibitoren sehr effektiv beeinflusst werden. Die extrinsische Aktivierung über den TF/F VIIa-Komplex beinhaltet nur einen Schritt, wodurch es sofort zur massiven Bildung von F Xa kommt, zu dessen Inaktivierung entsprechend höhere Konzentrationen des Inhibitors erforderlich sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass mit den verwendeten Inhibitoren der Frühphasenenzyme eine Hemmung der Thrombinbildung nach intrinsischer Aktivierung durchaus möglich ist. Die Hemmstoffe müssen jedoch in hohen Konzentrationen eingesetzt werden. Im Vergleich dazu erwies sich eine direkte F Xa-Hemmung als wesentlich effektiver, um die durch Aktivierung der Frühphase induzierte Bildung von Thrombin zu verhindern. Je stärker die verwendeten Hemmstoffe für F Xa waren, umso wirksamer wurde die Thrombinbildung blockiert.

Die Ergebnisse unterstützen die seit längerer Zeit laufenden Forschungen zur Entwicklung von F Xa-Hemmstoffen als wirksame Antikoagulanzen. Durch die zentrale Position dieses Faktors am Konvergenzpunkt von extrinsischem und intrinsischem Gerinnungssystem stellt er den optimalen Angriffspunkt dar (Kaiser 2002, Stürzebecher 2005). F Xa ist das aktive Enzym des Prothrombinase-Komplexes, welches die Bildung von Thrombin katalysiert. Eine Hemmung von F Xa

kann deshalb die fortwährende Neubildung von Thrombin verhindern und ermöglicht somit eine effektive und auch therapeutisch bedeutsame Kontrolle der Blutgerinnung. Die Entwicklung eines oral applizierbaren F Xa-Inhibitors würde zu einem neuartigen Antithrombotikum führen, das im Vergleich zu den bisher gebräuchlichen Antikoagulanzen wesentlich verbesserte pharmakodynamische und pharmakokinetische Eigenschaften aufweist.

Bisher wurden zahlreiche, zum Teil sehr wirksame, kleinmolekulare F Xa-Hemmstoffe synthetisiert (Maignan und Mikol 2001, Quan und Smallheer 2004, Pauls et al. 2004, Alexander und Singh 2005, Ieko et al. 2006). Wie auch bei den von uns untersuchten Hemmstoffen hatten viele dieser Inhibitoren eine Amidino-Struktur im Molekül. Bei den Benzamidinen war das Bis-Benzamidin BABCH die erste stark wirksame Verbindung (Stürzebecher et al. 1989). Dieser Inhibitor wurde von der Firma Berlex Biosciences (ZK 807834, $K_i = 0,1 \text{ nM}$) weiter entwickelt, so dass klinische Studien möglich wurden (Shaw et al. 1998). Die Verbindung FXV 673 (Otamixaban) der Firma Sanofi-Aventis ist ein wirksamer F Xa-Inhibitor, dessen chemische Struktur ebenfalls durch eine Amidino-Gruppe charakterisiert ist (Guertin et al. 2002). Dagegen besitzen die von der Firma Pfizer entwickelten Derivate (PD-198961, $K_i = 2,7 \text{ nM}$) einen substituierten Benzamidin-Rest (Willardsen et al. 2004).

Bei den sogenannten Naphthamidinen ist die Amidino-Gruppe an einem Naphthyl-Rest lokalisiert. Unter diesen Faktor Xa-Hemmstoffen ist DX-9065a der Firma Daiichi die bekannteste Verbindung (Katakura et al. 1993), die bereits in klinischen Studien geprüft wird. Auch die Inhibitoren der Firma Yamanouchi Pharmaceutical Co., wie beispielsweise YM-60828 ($K_i = 1,3 \text{ nM}$), gehören chemisch diesem Typ an (Hirayama et al. 2003).

Die Hemmstoffe DPC 423 ($K_i = 0,15 \text{ nM}$) und DPC 602 von Bristol-Myers-Squibb besitzen statt der stark basischen Benzamidin-Funktion einen Benzylamin-Rest (Quan und Wexler 2001). Als wirksamster Inhibitor sei DPC 906 (Razaxaban) genannt (Batt et al. 2004).

Derivate mit einem 5-Chlorthiophen-Rest wurden von den Firmen Bayer und Merck, Darmstadt entwickelt. Die wirksamsten Faktor Xa-Hemmstoffe sind die Verbindung BAY 59-7939 ($K_i = 0,4 \text{ nM}$) (Perzborn et al. 2005) und der Inhibitor EMD 495235 (Mederski et al. 2004a; Mederski et al. 2004b). Beide werden gegenwärtig in klinischen Studien geprüft.

Durch die Firma Eli Lilly wurde eine Gruppe von Chlorindol-Derivaten (K_i -Werte < 10 nM) entwickelt (Sheehan et al. 2003), während von Millennium Pharmaceuticals 1-Aminoisochinolin-Derivate bevorzugt wurden (Song et al. 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit den verwendeten Hemmstoffen der Frühphasenenzyme PK, F XIa und F XIIa eine Hemmung der Thrombinbildung nach Aktivierung des intrinsischen Gerinnungsweges möglich ist. Eine deutlich stärkere Hemmung der über die Aktivierung der Frühphasenenzyme ausgelösten Bildung von Thrombin lässt sich jedoch mit selektiven F Xa-Inhibitoren erreichen. Bei einer Aktivierung des Gerinnungssystems nach Kontakt des Blutes mit unphysiologischen Oberflächen und der daraus resultierenden Bildung von Thrombin bringt der Einsatz von Hemmstoffen der Frühphasenenzyme keinerlei Vorteile gegenüber selektiven, direkt wirksamen F Xa-Hemmstoffen.

7 Schlussfolgerung

Die in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren der Frühphasenenzyme PK, F XIa und F XIIa weisen eine unterschiedliche inhibitorische Wirksamkeit gegenüber den einzelnen Gerinnungsenzymen auf. Inhibitoren, die durch eine relativ hohe inhibitorische Wirkung gegen ein einzelnes Frühphasenenzym bzw. gegen alle 3 Frühphasenenzyme charakterisiert sind, hemmen die Frühphasen-induzierte Thrombinbildung in hohen, im mikromolaren Bereich liegenden Konzentrationen.

Inhibitoren, die zusätzlich zu den Frühphasenenzymen noch F Xa hemmen, verhindern die Thrombinbildung deutlich stärker als Hemmstoffe ohne Anti-FXa-Wirkung.

Untersuchungen mit hochspezifischen F Xa-Hemmstoffen zeigen die maßgebende Rolle von F Xa nach intrinsischer Aktivierung der Gerinnung. Durch diese Inhibitoren wird die durch die Aktivierung der Frühphasenenzyme induzierte Thrombinbildung bereits in submikromolaren Konzentrationen vollständig unterbunden.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich ableiten, dass mit selektiven Inhibitoren von Frühphasenenzymen eine Hemmung der Thrombinbildung möglich ist. Eine direkte Inaktivierung von F Xa durch hochwirksame spezifische Inhibitoren dieser Serinprotease bewirkt im Vergleich zur Inhibierung von Frühphasenenzymen eine deutlich effektivere Hemmung der Thrombinbildung. Somit sind Hemmstoffe der Frühphasenenzyme nicht geeigneter als F Xa-Hemmstoffe, um die Bildung von Thrombin und die daraus resultierende Entstehung von Fibrin nach Initiierung der Gerinnung durch Kontakt des Blutes mit unphysiologischen Oberflächen zu verhindern.

8 Literaturverzeichnis

Agnelli G. 2005. Current issues in anticoagulation. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 34: 2-9.

Aird WC. 2005. Coagulation. *Crit Care Med*, 33: S485-S487.

Alexander JH, Singh KP. 2005. Inhibition of factor Xa: a potential target for the development of new anticoagulants. *Am J Cardiovasc Drugs*, 5: 279-290.

Alexander JH, Yang H, Becker RC, Kodama K, Goodman S, Dyke CK, Kleiman NS, Hochman JS, Berger PB, Cohen EA, Lincoff AM, Burton JR, Bovill EG, Kawai C, Armstrong PW, Harrington RA. 2005. First experience with direct, selective factor Xa inhibition in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: results of the XaNADU-ACS trial. *J Thromb Haemost*, 3: 349-447.

Bajusz S, Barabás E, Tolnay P, Széll E, Bagdy D. 1978. Inhibition of thrombin and trypsin by tripeptide aldehydes. *Int J Peptide Protein Res*, 12: 217-221.

Batt DG, Qiao JX, Modi DP, Houghton GC, Pierson DA, Rossi KA, Luetzgen JM, Knabb RM, Jadhav PK, Wexler RR. 2004. 5-Amidinoindoles as dual inhibitors of coagulation factors IXa and Xa. *Bioorg Med Chem Lett*, 14: 5269–5273.

Bauer KA. 1999. Activation markers of coagulation. *Baillière 's Clin Haematol*, 12: 387-406.

Berkner KL. 2001. Blood clotting: general pathway. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group. London, England, 1-7.

Brummel KE, Paradis SG, Butenas S, Mann KG. 2002. Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood*, 100: 148-152.

- Butenas S, Brummel KE, Branda RF, Paradis SG, Mann KG. 2002. Mechanism of factor VIIa-dependent coagulation in hemophilia blood. *Blood*, 99: 923-930.
- Campbell DJ. 2001. The kallikrein-kinin system in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 28: 1060-1065.
- Cawthorn KM, van 't Veer C, Lock JB, DiLorenzo ME, Branda RF, Mann KG. 1998. Blood coagulation in hemophilia A and hemophilia C. *Blood*, 91: 4581-4592.
- Courtney JM, Forbes CD. 1994. Thrombosis on foreign surfaces. *Brit Med Bull*, 50: 966-981.
- Colman RW, Schmaier AH. 1997. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive and proinflammatory attributes. *Blood*, 90: 3819-3843.
- Dahlbäck B, Villoutreix BO. 2005. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Letters*, 579: 3310-3316.
- Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. 1991. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochem*, 30: 10363-10370.
- Delaria KA, Muller DK, Marlor CW, Brown JE, Das RC, Rocznik SO, Tamburini PP. 1997. Characterization of placental bikunin, a novel human serine protease inhibitor. *J Biol Chem*, 272: 12209-12214.
- Edmunds LH. 1993. Blood-surface interactions during cardiopulmonary bypass. *J Card Surg*, 8: 404-410.
- Fareed J, Messmore HL, Kindel G, Balis JU. 1981. Inhibition of serine proteinases by low molecular weight peptides and their derivatives. In: Walz DA und McCoy LE, Hrsg. *Annals of the New York Academy of Sciences. Bd 370: Contributions to Hemostasis. New York: The New York Academy of Sciences*, 765-784.

Fritsma GA. 2004. Direct thrombin inhibitors. *Clin Lab Sci*, 17: 118-123.

Furie B, Bouchard BA, Furie BC. 1999. Vitamin K-dependent biosynthesis of γ -carboxyglutamic acid. *Blood*, 93: 1798-1808.

Garrett GS, Correa PE, McPhail SI, Tornheim K, Burton JA, Eickoff DJ, Engerholm GG, McIver JM. 1998. Peptide aldehyde inhibitors of the kallikreins: an investigation of subsite interactions with tripeptides containing structural variations at the amino terminus. *J Pept Res*, 52: 60-71.

Garrett GS, McPhail SI, Tornheim K, Correa PE, McIver JM. 1999. Synthesis of potent and selective inhibitors of human plasma kallikrein. *Bioorg Med Chem Lett*, 9: 301-306.

Guertin KR, Gardner CJ, Klein SI, Zulli AL, Czekaj M, Gong Y, Spada AP, Cheney DL, Maignan S, Guilloteau JP, Brown KD, Colussi DJ, Chu V, Heran CL, Morgan SR, Bentley RG, Dunwiddie CT, Leadley RJ, Pauls HW. 2002. Optimization of the β -aminoester class of factor Xa inhibitors. Part 2: Identification of FXV673 as a potent and selective inhibitor with excellent in vivo anticoagulant activity. *Bioorg Med Chem Lett*, 12: 1671-1674.

Hirsh J, O'Donnell M, Weitz JI. 2005. New anticoagulants. *Blood*, 105: 453-463.

Hirayama F, Koshio H, Katayama N, Ishihara T, Kaizawa H, Taniuchi Y, Sato K, Sakai-Moritani Y, Kaku S, Kurihara H, Kawasaki T, Matsumoto Y, Sakamoto S, Tsukamoto S. 2003. Design, synthesis and biological activity of YM-60828 derivatives. Part 2: Potent and orally-bioavailable factor Xa inhibitors based on benzothiadiazine-4-one templates. *Bioorg Med Chem*, 11: 367-381.

Hoppensteadt D, Walenga JM, Fareed J, Bick RL. 2003. Heparin, low-molecular-weight heparins, and heparin pentasaccharide. Basic and clinical differentiation. *Hematol Oncol Clin N Am*, 17: 313-341.

- Huntington JA. 2003. Mechanisms of glycosaminoglycan activation of the serpins in hemostasis. *J Thromb Haemost*, 1: 1535-1549.
- Ieko M, Tarumi T, Nakabayashi T, Yoshida M, Naito S, Koike T. 2006. Factor Xa inhibitors: new anti-thrombotic agents and their characteristics. *Front Biosci*, 11: 232-248.
- Isobe J. 1981. Inhibitory effect of gabexate (FOY) on contact system. *Blood Vessel*, 12: 135-138.
- Kaiser B, Fareed J, Walenga JM, Hoppensteadt D, Markwardt F. 1991. In vitro studies on thrombin generation in citrated, hirudinized and heparinized whole blood. *Thromb Res*, 64: 589-596.
- Kaiser B, Fareed J, Hoppensteadt D, Birdsong B, Walenga JM, Markwardt F. 1992. Influence of recombinant hirudin and unfractionated heparin on thrombin and factor Xa generation in extrinsic and intrinsic activated systems. *Thromb Res*, 65: 157-164.
- Kaiser B, Jeske W, Walenga JM, Fareed J. 1999. Inactivation of factor Xa by the synthetic inhibitor DX-9065a causes strong anticoagulant and antiplatelet actions in human blood. *Blood Coag Fibrinol*, 10: 495-501.
- Kaiser B. 2002. Factor Xa – a promising target for drug development. *Cell Mol Life Sci*, 59: 189-192.
- Kaplan AP, Joseph K, Shibayama Y, Reddigari S, Ghebrehiwet B, Silverberg M. 1997. The intrinsic coagulation/kinin-forming cascade: assembly in plasma and cell surfaces in inflammation. *Adv Immunol*, 66: 225-272.
- Katakura S, Nagahara T, Hara T, Iwamoto M. 1993. A novel factor Xa inhibitor: structure-activity relationships and selectivity between factor Xa and thrombin. *Biochem Biophys Res Comm*, 197: 965-972.

- Kettner C, Shaw E. 1979. D-Phe-Pro-ArgCH₂Cl – a selective affinity label for thrombin. *Thromb Res*, 14: 969-973.
- Koide T, Kato H, Davie EW. 1976. Bovine factor XI (plasma thromboplastin antecedent). In: Lorand L, Hrsg. *Methods in Enzymology*. Bd 45B. New York: Academic Press, 66-73.
- Komiyama Y, Pedersen AH, Kisiel W. 1990. Proteolytic activation of human factors IX and X by recombinant human factor VIIa: effects of calcium, phospholipids, and tissue factor. *Biochem*, 29: 9418-9425.
- Koshio H, Hirayama F, Ishihara T, Shiraki R, Shigenaga T, Taniuchi Y, Sato K, Moritani Y, Iwatsuki Y, Kaku S, Katayama N, Kawasaki T, Matsumoto Y, Sakamoto S, Tsukamoto S. 2005. Synthesis and biological activity of novel 1,2-disubstituted benzene derivatives as factor Xa inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 13: 1305-1323.
- Leone G, Rossi E, Leone AM, De Stefano V. 2004. Novel antithrombotic agents: indirect synthetic inhibitors of factor Xa and direct thrombin inhibitors. Evidences from clinical studies. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*, 2: 311-326.
- Lwaleed BA, Bass PS. 2006. Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *J Pathol*, 208: 327-339.
- Maignan S, Mikol V. 2001. The use of 3D structural data in the design of specific factor Xa inhibitors. *Curr Top Med Chem*, 1: 161-174.
- Mann KG. 1976. Prothrombin. In: Lorand L, Hrsg. *Methods in Enzymology*. Bd 45B. New York: Academic Press, 123-156.
- Mann KG, Butenas S, Brummel K. 2003. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 17-25.
- Markwardt F. 1957. Die Isolierung und chemische Charakterisierung des Hirudins. *Hoppe Seyler's Z Physiol Chem*, 308: 147-156.

Markwardt F. 1970. Hirudin is an inhibitor of thrombin. *Meth Enzymol*, 19: 924-932.

Martin DMA, Boys CWG, Ruf W. 1995. Tissue factor: molecular recognition and cofactor function. *FASEB J*, 9: 852-859.

Mederski WWKR, Dorsch D, Anzali S, Gleitz J, Cezanne B, Tsaklakidis C. 2004a. Halothiophene benzimidazoles as P1 surrogates of inhibitors of blood coagulation factor Xa. *Bioorg Med Chem Lett*, 14: 3763-3769.

Mederski WWKR, Cezanne B, van Amsterdam C, Bühring KU, Dorsch D, Gleitz J, März J, Tsaklakidis C. 2004b. Chlorothiophenecarboxamides as P1 surrogates of inhibitors of blood coagulation factor Xa. *Bioorg Med Chem Lett*, 14: 5817-5822.

Menear K. 1999. Direct thrombin inhibitors: current status and future prospects. *Exp Opin Invest Drugs*, 8: 1373-1384.

Monroe DM, Hoffman M. 2006. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26: 41-48.

Muramatu M, Satoh T, Yanagimoto Y, Kanamoto Y, Katsuyama I, Kanemoto M, Taguchi K. 1982. Inhibitory effects of aryl trans-4-(aminomethyl)cyclohexanecarboxylate and aryl trans-4-(guanidinomethyl)cyclohexanecarboxylate on serine proteases, and their antiallergic effects. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 363: 203-211.

Norris LA. 2003. Blood coagulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 17: 369-383.

Nutescu EA, Shapiro NL, Chevalier A, Amin AN. 2005. A pharmacologic overview of current and emerging anticoagulants. *Clev Clin J Med*, 72: S2-S6.

Okamoto S, Hijikata A, Kikumoto R, Tonomura S, Hara H, Ninomiya Y, Maruyama A, Sugano M, Tamao Y. 1981. Potent inhibition of thrombin by the newly synthesized arginine derivate no. 805: the importance of the stereostructure of its hydrophobic carboxamide portion. *Biochem Biophys Res Commun*, 101: 440-446.

Okamoto S, Okamoto U, Hijikata-Okunomiya A, Wanaka K, Okada Y. 1988. Recent studies of the synthetic selective inhibitors with special reference to non-plasmin fibrinolytic enzyme, plasmin and plasma kallikrein. *Thromb Res Suppl*, 8: 131-141.

Okamoto S, Wanaka K, Hijikata-Okunomiya A, Okada Y, Katsuura Y. 1992. A finding of highly selective synthetic inhibitor of plasma kallikrein: its action to bradykinin generation, intrinsic coagulation and experimental DIC. *Agents Actions Suppl*, 38: 198-205.

Østerud B. 1997. Tissue factor: a complex biological role. *Thromb Haemost*, 78:755-758.

Pauls HW, Ewing WR, Choi-Sledewski YM. 2004. The design of competitive, small-molecule inhibitors of coagulation factor Xa. *Front Med Chem-Online*, 1: 129-152.

Perzborn E, Strassburger J, Wilmen A, Pohlmann J, Roehrig S, Schlemmer K-H, Straub A. 2005. In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939 - an oral, direct Factor Xa inhibitor. *J Thromb Haemost*, 3: 514-521.

Prasa D. 1992. Untersuchungen zur Hemmung von Plasma-Kallikrein und Faktor XIIa durch Derivate des Benzamidins - Einsatz von Hemmstoffen des Plasma-Kallikreins zur Beeinflussung der Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems [Dissertation]. Halle: Martin-Luther-Universität.

Price GC, Thompson SA, Kam PCA. 2004. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor. *Anaesthesia*, 59: 483-492.

Quan ML, Wexler RR. 2001. The design and synthesis of noncovalent factor Xa inhibitors. *Curr Top Med Chem*, 1: 137-149.

- Quan ML, Smallheer JM. 2004. The race to an orally active factor Xa inhibitor: Recent advances. *Curr Opin Drug Discov Dev*, 7: 460-469.
- Rai R, Sprengeler PA, Elrod KC, Young WB. 2001. Perspectives on factor Xa inhibition. *Curr Med Chem*, 8: 101-119.
- Rattnoff OD. 1981. Studies on the inhibition of ellagic acid-activated Hageman factor (factor XII) and Hageman factor fragments. *Blood*, 57: 55-58.
- Riess FC, Lower C, Seelig C. 1995. Recombinant hirudin as a new anticoagulant during cardiac operations instead of heparin: successful for aortic valve replacement in man. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 110: 265-267.
- Satoh T, Muramatsu M, Ooi Y, Mivataka H, Nakajima T, Umeyama M. 1985. Medicinal chemical studies on synthetic protease inhibitors, trans-4-guanidino-methylcyclohexanecarboxylic acid aryl esters. *Chem Pharm Bull*, 33: 647-654.
- Schenone M, Furie BC, Furie B. 2004. The blood coagulation cascade. *Curr Opin Hematol*, 11: 272-277.
- Schettler G, Greten H. 1998. Grundlagen der Hämostaseologie. In: *Innere Medizin. Stuttgart, New York: Thieme-Verlag*, 343-369.
- Schmaier AH. 2002. The plasma kallikrein-kinin-system counterbalances the renin-angiotensin-system. *J Clin Invest*, 109: 1007-1009.
- Schweinitz A, Steinmetzer T, Banke IJ, Arlt MJE, Stürzebecher A, Schuster O, Geissler A, Giersiefen H, Zeslawska E, Jacob U, Krüger A, Stürzebecher J. 2004. Design of novel and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator with improved pharmacokinetic properties for use as antimetastatic agents. *J Biol Chem*, 279: 33613–33622.

Shaw KJ, Guilford WJ, Dallas JL, Koovakkaat SK, McCarrick MA, Liang A, Light DR, Morrissey MM. 1998. (Z,Z)-2,7-Bis(4-amidinobenzylidene)cycloheptan-1-one: identification of a highly active inhibitor of blood coagulation factor Xa. *J Med Chem*, 41: 3551-3556.

Sheehan SM, Masters JJ, Wiley MR, Young SC, Liebeschuetz JW, Jones SD, Murray CW, Franciskovich JB, Engel DB, Weber WW, Marimuthu J, Kyle JA, Smallwood JK, Farnen MW, Smith GF. 2003. A four component coupling strategy for the synthesis of D-phenylglycinamide-derived non-covalent factor Xa inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 13: 2255-2259.

Sinha U. 1999. Synthetic inhibitors of coagulation factor Xa. *Exp Opin Invest Drugs*, 8: 567-573.

Silverberg M, Kaplan AP. 1982. Enzymatic activities of activated and zymogen forms of human Hageman factor (factor XII). *Blood*, 60: 64-70.

Song Y, Clizbe L, Bhakta C, Teng W, Li W, Wong P, Huang B, Sinha U, Park G, Reed A, Scarborough RM, Zhu BY. 2002. Substituted acrylamides as factor Xa inhibitors: improving bioavailability by P1 modification. *Bioorg Med Chem Lett*, 12: 2043-2046.

Stassen JM, Arnout J, Deckmyn H. 2004. The hemostatic system. *Curr Med Chem*, 11: 2245-2260.

Steffel J, Lüscher TF, Tanner FC. 2006. Tissue factor in cardiovascular diseases. Molecular mechanisms and clinical implications. *Circulation*, 113: 722-731.

Steinmetzer T, Stürzebecher J. 2004. Rationales Design von Thrombinhemmstoffen. *Pharmazie*, 33: 196-205.

Stone SR, Hofsteenge J. 1986. Kinetics of inhibition of thrombin by hirudin. *Biochemistry*, 25: 4622-4628.

Stürzebecher A. 2005. Optimierung synthetischer Inhibitoren des Gerinnungsfaktors Xa vom Amidinobenzylamid-Typ [Dissertation]. *Marburg: Phillips-Universität*

Stürzebecher J, Kleßen C, Markwardt F. 1983. Chemische Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen Plasmakallikrein und anderen Serinproteinasen des Blutes. *Zentralbl Pharm Pharmakother Lab Diagn*, 122: 240-241.

Stürzebecher J, Stürzebecher U, Vieweg H, Wagner G, Hauptmann J, Markwardt F. 1989. Synthetic inhibitors of bovine factor Xa and thrombin comparison of their anticoagulant efficiency. *Thromb Res*, 54: 245-252.

Stürzebecher J, Steinmetzer T, Künzel S, Schweinitz A:
Hemmstoffe für den Gerinnungsfaktor Xa.
WO 01/96366 (2001).

Stürzebecher J, Steinmetzer T, Schweinitz A:
Hemmstoffe des Gerinnungsfaktors Xa, ihre Herstellung und Verwendung.
WO 03/076457 (2003).

Stürzebecher J, Steinmetzer T, Schweinitz A:
Acylierte 4-Amidino- und 4-Guanidinobenzylamine zur Inhibierung von Plasma-
kallikrein.
WO 2004/062657 (2004).

Stürzebecher J, Steinmetzer T, Schweinitz A, Stürzebecher A, Dönnecke D:
Basisch-substituierte Benzylaminanaloge als Inhibitoren des Gerinnungsfaktors Xa,
ihre Herstellung und Verwendung.
WO 2005/026198 (2005).

Swartz MF, Fink GW, Searles B. 2004. Aprotinin and hemostasis monitoring concerns during cardiac surgery. *J Extra Corpor Technol*, 36: 375-383.

Tanaka KA, Szlam F, Katori N, Vega JD, Levy JH. 2004. Evaluation of a novel kallikrein inhibitor on hemostatic in vitro. *Thromb Res*, 113: 333-339.

Teno N, Wanaki K, Okada Y, Tsuda Y, Okamoto U, Hijikata-Okunomiya A, Naito T, Okamoto S. 1991. Development of selective inhibitors against plasma kallikrein. *Chem Pharm Bull*, 39: 2930-2936.

Triplett DA. 2000. Coagulation and bleeding disorders: review and update. *Clin Chem*, 46: 1260-1269.

Tsuda Y, Tada M, Wanaka K, Okamoto U, Hijikata-Okunomiya A, Okamoto S, Okada Y. 2001. Structure-inhibitory activity relationship of plasmin and plasma kallikrein inhibitors. *Chem Pharm Bull*, 49: 1457-1463.

Vasquez JC, Vichiendilokkul A, Mahmood S, Baciewicz FA Jr. 2002. Anticoagulation with bivalirudin during cardiopulmonary bypass in cardiac surgery. *Ann Thorac Surg*, 74: 2177-2179.

Weitz JI, Crowther MA. 2003. New anticoagulants: current status and future potential. *Am J Cardiovasc Drugs*, 3: 201-209.

Willardsen JA, Dudley DA, Cody WL, Chi L, McClanahan TB, Mertz TE, Potoczak RE, Narasimhan LS, Holland DR, Rapundalo ST, Edmunds JJ. 2004. Design, synthesis, and biological activity of potent and selective inhibitors of blood coagulation factor Xa. *J Med Chem*, 47: 4089-4099.

Williams A, Baird LG. 2003. DX-88 and HAE: a development perspective. *Transfus Sci*, 29: 255-258.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. Stürzebecher für die Bereitstellung des Themas und seine Bereitschaft diese Arbeit zu betreuen sowie für die mir gewährte Unterstützung bei der wissenschaftlichen Erarbeitung und Fertigstellung der Dissertation.

Frau Dr. U. Stürzebecher danke ich für die vielfältige Hilfe bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen.

Ebenso danke ich Frau PD Dr. B. Kaiser für die zahlreichen fachlichen Ratschläge und die umfangreiche Unterstützung bei der Erstellung und Korrektur des Manuskripts.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. J. Stürzebecher am Institut für Vaskuläre Medizin der FSU Jena.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. J. Stürzebecher und Frau PD Dr. B. Kaiser,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,

ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erfurt, den 24. Juli 2006